

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Klára Dvořáková

**Molekulárně genetická analýza aspiračních biopsií tenkou  
jehlou u nádorů štítné žlázy**

The molecular genetic analysis of fine needle aspiration biopsy  
samples of thyroid tumors

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Vlasta Sýkorová, Ph.D.

Praha 2019

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 19.8.2019

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat především své školitelce RNDr. Vlastě Sýkorové, Ph.D. za odborné vedení, přínosné připomínky a trpělivost jak při psaní práce, tak v laboratoři. Dále děkuji RNDr. Markétě Vaňkové, Ph.D. za ochotu a ohromnou pomoc se statistickým vyhodnocením výsledků. V neposlední řadě patří velké díky моým rodičům, kteří mě během studia podporovali ve všech směrech, jak jen mohli, a blízkým přátelům, díky nimž se stalo toto období mojí oblíbenou životní etapou.

**ABSTRAKT:**

Cílem bakalářské práce je shrnutí současných poznatků ve světové literatuře o nádorech štítné žlázy a molekulárně genetická analýza vzorků získaných pomocí biopsie tenkou jehlou u pacientů postihujících toto onemocnění pomocí moderních metod s následným statistickým zpracováním dat. Text pojednává o vyšetření a klasifikaci nádorů štítné žlázy a následné terapii. Zmiňuje nejčastější genetické mutace způsobující tyto karcinomy a dává je do kontextu s využitím miRNA jako biomarkerů. V experimentální části je k analýze míry exprese RNA a miRNA užitá metoda reverzní transkripce ve spojení s kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase. K jejímu vyhodnocení byla užitá srovnávací metoda  $\Delta\Delta C_t$ .

**KLÍČOVÁ SLOVA:** Genetika, nádory štítné žlázy, aspirační biopsie tenkou jehlou, polymerázová řetězová reakce

**ABSTRACT:**

The aim of the bachelor thesis is to summarize the current knowledge in world literature about thyroid tumors and molecular genetic analysis of fine-needle aspiration biopsy samples of patients, who suffer from this disease using modern methods followed by statistical data evaluation. The text concerns with examination and classification of thyroid tumors and follow-up treatment. It mentions the most common genetic mutations causing these carcinomas in connection with using miRNA as biomarkers. In the experimental part, a method of reverse transcription in conjunction with quantitative real-time polymerase chain reaction is used to analyze the RNA and miRNA expression levels. The  $\Delta\Delta C_t$  comparison method was used to evaluate it.

**KEYWORDS:** Genetics, thyroid tumors, fine needle aspiration biopsy, polymerase chain reaction

## Obsah

1 Teoretická část.....	9
1.1 Štítná žláza.....	9
1.2 Nádorová onemocnění štítné žlázy .....	11
1.3 Vyšetření štítné žlázy pomocí FNAB .....	12
1.3.1 Systém Bethesda .....	13
1.3.2 Další klinické postupy u malignit.....	14
1.4 Mutace související s TC.....	16
1.4.1 <i>BRAF</i> mutace.....	17
1.4.2 <i>TERT</i> mutace .....	17
1.4.3 <i>RET</i> mutace .....	18
1.4.4 <i>RAS</i> mutace .....	18
1.5 MicroRNA a její význam v diagnostice a terapii TC .....	18
1.6 Metody užívané k analýze tkáně na molekulární úrovni .....	20
2 Cíle práce.....	22
3 Experimentální část .....	23
3.1 Přístroje.....	23
3.2 Chemikálie .....	23
3.3 Soubor.....	24
3.4 Izolace genetického materiálu z FNAB z cytologických sklíček .....	25
3.5 Reverzní transkripce .....	26
3.5.1 Reverzní transkripce RNA .....	28
3.5.2 Reverzní transkripce miRNA.....	28
3.6 qRT-PCR .....	30
3.6.1 Detekce <i>RET/PTC</i> přeskupení.....	31
3.6.2 Relativní kvantifikace miRNA.....	32
3.7 Optimalizace .....	33
3.8 Účinnost reakce.....	34
3.9 Výpočet míry exprese miRNA .....	34
3.10 Statistické vyhodnocení .....	35
4 Výsledky.....	36

4.1 <i>RET/PTC</i> přeskupení .....	36
4.2 Relativní kvantifikace miRNA .....	36
4.2.1 Sloupcové grafy.....	40
4.2.2 Krabicové grafy.....	42
4.2.3 Bodové grafy.....	50
5 Diskuze .....	52
6 Závěr.....	56

## Seznam užitých zkratek a symbolů

<b>TC</b>	karcinom štítné žlázy (z angl. thyroid carcinoma)
<b>DTC</b>	diferencovaný karcinom štítné žlázy (z angl. differentiated thyroid carcinoma)
<b>PDTC</b>	nízce diferencovaný karcinom štítné žlázy (z angl. poorly differentiated thyroid carcinoma)
<b>PTC</b>	papilární karcinom štítné žlázy (z angl. papillary thyroid carcinoma)
<b>cPTC</b>	klasická varianta papilárního karcinomu štítné žlázy (z angl. classical papillary thyroid carcinoma)
<b>fvPTC</b>	folikulární varianta papilárního karcinomu štítné žlázy (z angl. follicular variant of papillary thyroid carcinoma)
<b>FTC</b>	folikulární karcinom štítné žlázy (z angl. follicular thyroid carcinoma)
<b>ATC</b>	anaplastický karcinom štítné žlázy (z angl. anaplastic thyroid carcinoma)
<b>MTC</b>	medulární karcinom štítné žlázy (z anglického medullary thyroid carcinoma)
<b>FNAB/FNAC</b>	tenkojehlová aspirační biopsie/cytologie (z angl. fine-needle aspiration biopsy/cythology)
<b>BSRTC</b>	Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology
<b>RISC</b>	RNA indukovaný tlumicí komplex (z angl. RNA-induced silencing complex)
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
<b>dPCR</b>	digitální polymerázová řetězová reakce (z angl. digital polymerase chain reaction)
<b>qPCR</b>	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (z angl. quantitative real-time polymerase chain reaction)
<b>qRT-PCR</b>	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (z angl. quantitative real-time polymerase chain reaction)
<b>cDNA</b>	komplementární DNA (z angl. complementary DNA)

## Úvod

Stále populárnějším tématem molekulární genetiky a medicíny se stávají příčiny vzniku karcinomů štítné žlázy. Jedná se o nejčastěji detekovaná nádorová onemocnění endokrinního systému, počet nálezů těchto nádorů stále stoupá. Nejnovější výzkumy pracující na molekulární úrovni se zabývají mutacemi, které vedou k anomální míře exprese příslušných nukleových kyselin a podněcují tato rakovinná bujení.

Teoretická část této práce shrnuje poznatky ze světové literatury, jsou v ní uvedeny rozličné druhy karcinomů štítné žlázy, kategorizace cytologických nálezů dle jejich závažnosti pomocí systému Bethesda, doporučený způsob léčby a miRNA, které je v daných případech teoreticky možné využít jako potenciální biomarkery.

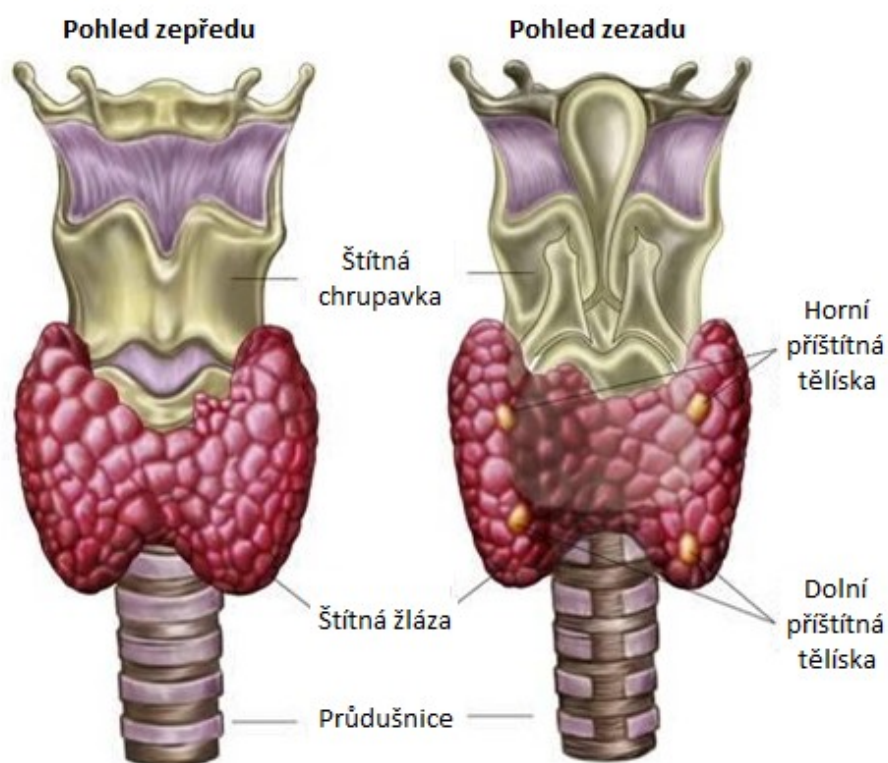
V experimentální části je pracováno se souborem vzorků FNAB (aspirační biopsie tenkou jehlou), z nichž jsou získány RNA včetně miRNA. Cílem je stanovení míry exprese, především miR-146b a miR-221, a porovnání se známými mutacemi. Ke stanovení je nutno nejprve provést reverzní transkripci, poté dochází ke kvantitativní polymerázové řetězové reakci v reálném čase, jejíž průběh reflektuje fluorescenční amplifikační křivka. V případě miRNA byly výsledné hodnoty vyhodnocovány metodou  $\Delta\Delta C_t$ . U analýzy *RET/PTC* byl průběh křivky tání srovnáván s pozitivními kontrolami, díky čemuž bylo možno stanovit, zda pacient má *RET/PTC* mutaci, či nikoliv.



# 1 Teoretická část

## 1.1 Štítná žláza

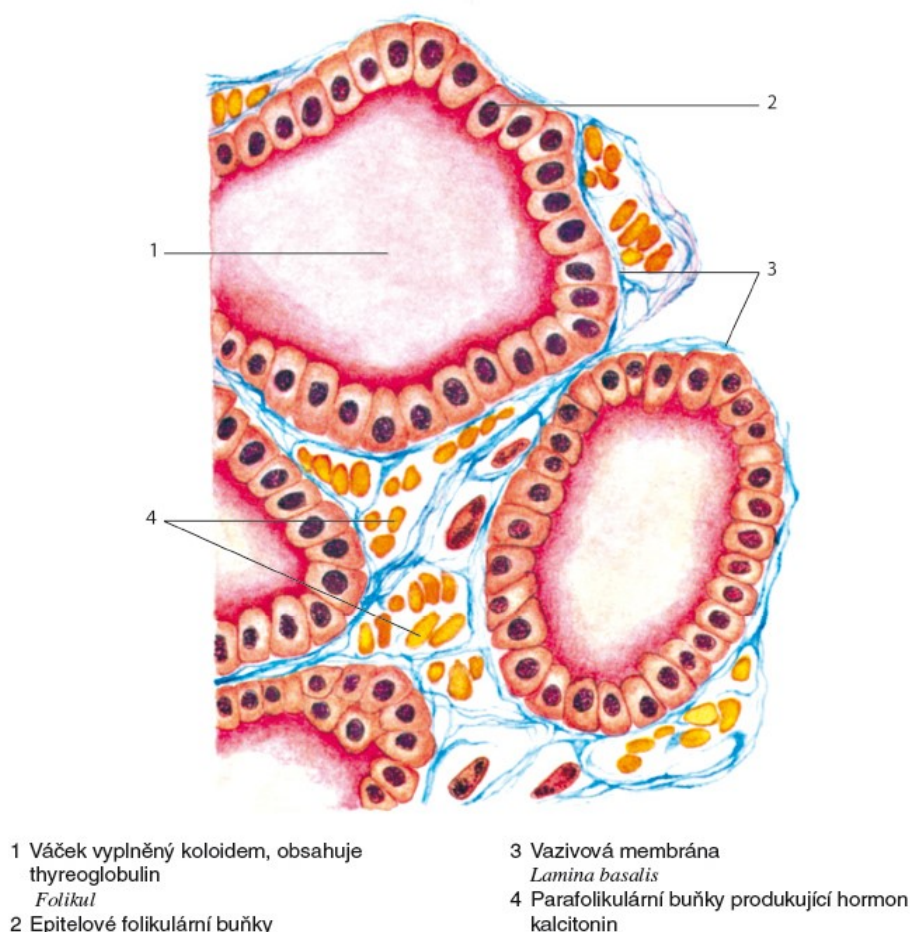
Štítná žláza (lat. glandula thyroidea), též zvaná jen tyreoidea, je jedním z orgánů endokrinní soustavy situovaný v přední krční oblasti, před štítnou chrupavkou. Tento orgán motýlovitého tvaru o objemu 18 až 22 ml je složen ze dvou laterálních laloků obklopujících hrtan, spojuje je můstek – isthmus a chrání vazivové pouzdro – capsula fibrosa. V zadní části na něj přiléhají dva páry (horní a dolní) příštítných tělísek (lat. glandulae parathyroideae) hráškovitých rozměrů i tvaru, jež se na humorálním systému těla také podílí – syntetizují parathormon.



Obr. 1.1: Anatomie štítné žlázy (převzato a upraveno z: <https://www.thoughtco.com>)

Základní mikroskopickou jednotkou tyreoidey jsou folikuly – duté váčky složené z vazkého koloidu, který obsahuje produkty jednovrstvého epitelu folikulárních buněk, thyroxin a trijodthyronin. Mezifolikulární prostor vyplňují buňky parafolikulární, též

nazývané C-buňky, vyrábějící hormon kalcitonin. Sekreci příslušných hormonů do krve či lymfy pomocí proteinových transportérů (převážně globulinů nacházejících se rovněž v koloidu) regulují další orgány s vnitřní sekrecí, a to hypothalamus a hypofýza.



Obr. 1.2: Mikroskopické histologické zobrazení štítné žlázy (převzato z: <https://is.muni.cz>)

Štítná žláza je nezbytnou součástí kaskádovitého řízení endokrinního systému díky zpětným negativním reakcím, dále její aktivní látky hrají roli v metabolismu živin – přeměně sacharidů, lipidů, proteinů, ovlivňuje energetické hospodaření buněk, spotřebu kyslíku, vyrovnává bilanční hladiny koncentrací vápníku a fosforu v krvi a kostech, je důležitá pro správný mentální i tělesný vývoj během prenatálního a postnatálního období. Syntéza tyreoidálních hormonů závisí na dostatku jodu v těle, jenž je pomocí NIS (sodík-jodidový symportér) vychytáván folikulárními buňkami z krevního oběhu (R. Čihák et al., 2002; J. Bureš et al., 2003; J. Jiskra, 2011a).

## 1.2 Nádorová onemocnění štítné žlázy

Tyreopathie (souhrnné označení pro nemoci štítné žlázy) mohou být doprovázeny nadměrnou či nedostatečnou funkcí štítné žlázy (hypertyreózou nebo hypotyreózou), v případě nádorových onemocnění však bývá činnost tyreoidy v normě (eutyreóza). V této situaci mohou být viditelnými a hmatatelnými příznaky onemocnění tyreoidální uzly. Během života se vyskytnou až u 10 % populace, 5–10 % uzlů je pak diagnostikováno jako maligních (J. Jiskra, 2011a).

Karcinomy štítné žlázy se rozlišují na papilární, folikulární, nízce diferencované, anaplastické a medulární. V součtu pacienti trpící TC tvoří zhruba 1 % z množiny lidí sužovaných rakovinou, zároveň se jedná o nejčastěji detekované zhoubné onemocnění endokrinní soustavy. Jejich výskyt neustále roste, v České republice bývá detekováno přibližně 600 nových případů TC ročně (J. Jiskra, 2011b; P. Vlček, 2015), přičemž nejvíce se vyskytují diferencované karcinomy (DTC) – papilární (PTC; 75–80 %) a folikulární (FTC; 10–15 %). Zatímco tyto TC obvykle rostou pomalu, u dospělých jedinců ve většině případů nepodněcují sekundární rakovinná bujení mimo štítnou žlázu a jejich léčba bývá většinou úspěšná (u PTC je šance na přežití 90 % po 10 letech od projevu nemoci v závislosti na jejím stadiu) (J. C. Lee et al., 2013), nízce diferencované (PDTC; <7 %) a anaplastické (nediferencované) karcinomy (ATC; 2 %), velmi vzácné a agresivní tumory s rychlým růstem a šířením do dalších částí těla pomocí metastáz, mají prognózu přežití nižší (šance na přežití po 5 letech od projevu nemoci je 50 % u PDTC a 7 % u ATC). Obecně se prognóza přežití s klesající mírou diferenciací snižuje. Medulární karcinom (MTC, <5 %) patří zrovna tak mezi formy méně obvyklé, zato s větší agresivitou, rychlým růstem, náročnější terapií a pravděpodobnější invazí i do okolních orgánů. Na rozdíl od ostatních typů vznikajících z folikulárních buněk, vzniká medulární karcinom z buněk parafolikulárních a objevuje se sporadicky nebo familiárně. Šance na přežití po 5 letech od projevu nemoci je pouze 86 % (S. Forte et al., 2015; G. C. Penna et al., 2017).

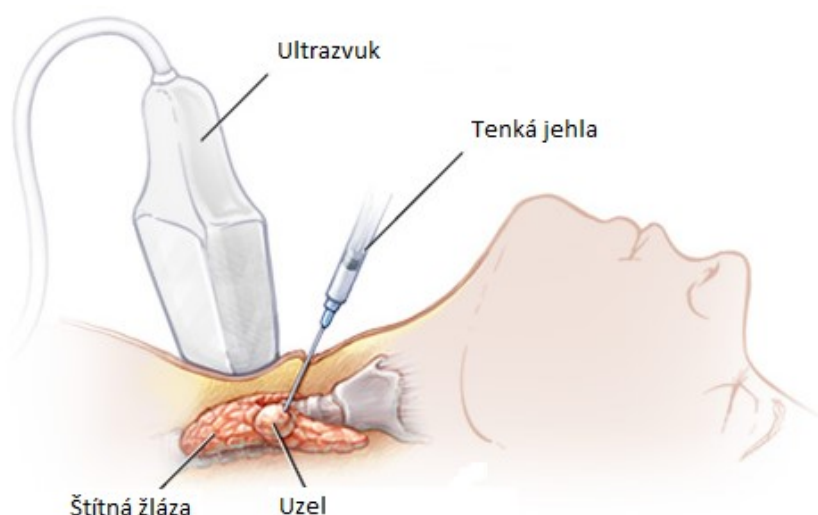
Jednotlivé TC vykazují specifické biologické chování, a proto vyžadují i specifický přístup a terapii – např. chirurgický zákrok je základní terapií pro všechny TC, u PTC a FTC bývá následně podáván radiojod, ale u ATC (v důsledku dediferenciací

buňky ztratí schopnost vychytávat jod) a MTC (parafolikulární původ, jod pohlcují buňky folikulární) je buněčná akumulace radiojodu léčebně nepoužitelná. Globálně se udává, že TC se objevuje 5x častěji u žen než u mužů. Zvýšené riziko nálezu je též u osob majících: benigní adenom štítné žlázy, karcinom štítné žlázy v rodinné anamnéze, nedostatek nebo naopak nadbytek jodu, zvětšené lymfatické uzliny a u lidí v minulosti vystavených radioaktivnímu záření (J. Jiskra, 2011a).

### 1.3 Vyšetření štítné žlázy pomocí FNAB

V současné době je základní vyšetřovací metodou uzlů ultrasonografie. Má-li pacient tyreoidální uzel, obvykle dochází cca jednou za půl roku na ultrazvukovou kontrolu. Je-li velikost uzlu větší než 10 mm, má jiné neobvyklé vlastnosti (např. nadměrné prokrvení) či se zaznamená podezřelý nárůst tkáně, provádí se vyšetření pomocí aspirační biopsie tenkou jehlou (FNAB).

Odběr tkáně se vykonává ambulantně, kdy je proveden vpich tenkou jehlou u pacienta ležícího na lůžku. Jehla se zavádí pod kontrolou ultrazvuku. Poté jsou shluky buněk nasáty pomocí injekční stříkačky, rozetřeny na sklíčko a poslány na cytologické vyšetření, kde jsou obarveny a mikroskopicky vyšetřeny. Toto vyšetření je relativně levné, rychlé (výsledky bývají vyhodnoceny v řádu dnů), není při něm nutná ani lokální anestezie, avšak nezaručuje stoprocentní detekci zhoubného nádoru (J. Jiskra, 2011b).



Obr. 1.3: FNAB štítné žlázy (převzato a upraveno z: <https://www.mayoclinic.org>)

### 1.3.1 Systém Bethesda

K hodnocení tenkojehlových aspiračních cytologií štítné žlázy byla v roce 2010 zavedena jednotná klasifikace známá pod názvem Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology (BSRTC). Než vešla v obecnou platnost, prošla několikaletým užíváním americkými experty. Roku 2007 National Cancer Institute v Bethesda uspořádal konferenci zaměřenou především na problematiku týkající se rozlišování cytologických nálezů štítné žlázy. Cílem bylo sjednocení terminologie a snížení počtu operací, jenž byl zbytečně navyšován operativními zákroky u pacientů s benigními lézemi, i na mezinárodní úrovni.

BSRTC rozlišuje šest kategorií, u nichž je popsáno procentuální riziko malignity a doporučen další klinický postup (M. Ludvíková et al., 2014).

Tab. 1.1: Standardní mezinárodní klasifikace FNAC štítné žlázy – 2017 Bethesda. U třetí a čtvrté kategorie jsou povoleny oba názvy, avšak preferován bývá první jmenovaný. NIFT – neinvazivní folikulární tyreoidální neoplazie, CA - karcinom (E. S. Cibas et al., 2017).

Diagnostická kategorie	Riziko malignity [%], NIFT:		Klinické doporučení
	=CA	≠CA	
1. Nediagnostický/neuspokojivý	5–10	5–10	Reaspirace
2. Benigní	0–3	0–3	Klinické a sonografické sledování
3. Atypie nejasného významu/Folikulární léze nejasného významu	6–18	10–30	Reaspirace, molekulární testování, lobektomie
4. Suspekce na folikulární neoplazii/Folikulární neoplazie	10–40	25–40	Molekulární testování, lobektomie
5. Suspektní z malignity (kromě folikulárního karcinomu)	45–60	50–75	Lobektomie/tyreoidektomie
6. Maligní	94–96	97–99	Lobektomie/tyreoidektomie

Systém přispěl k reprodukovatelnosti cytopatologických nálezů mezi klinikami, počet operací štítné žlázy se skutečně snížil, problematika zůstává jen 3. diagnostická kategorie. Nedostatkem BSRTC je především intra- a interpersonální variabilita

v posuzování vzorků. Například v jedné ze studií bylo dosaženo konsenzu pro malignity 80 %, pro benignity 73 %. Kritizovány jsou též požadavky pro reprezentativní vzorek, jenž musí obsahovat minimálně 6 skupin folikulárních buněk, přičemž každá skupina musí obsahovat buněk alespoň 10. Množství reaspirací tak stoupá (M. Ludvíková et al., 2014).

BSRTC se neustále vyvíjí, nejnovější norma pochází z roku 2017 (důsledek symposia konaného roku 2016 v Yokohamě). V ní je spočítáno riziko malignity, které jednou zahrnuje neinvazivní folikulární tyreoidální neoplazie papilárního typu (NIFTP) mezi karcinomy (CA), a podruhé tento dle WHO nově klasifikovaný typ vyčleňuje z malignit. Předmětem zájmu je také rozsah chirurgického zákroku v případě, že nález spadá do 5. nebo 6. kategorie. Mnohé studie proto nabádají k molekulární analýze biopsií. Všeobecně je doporučována lobektomie, téměř totální (subtotální) tyreoidektomie nebo totální tyreoidektomie (E. S. Cibas et al., 2017).

### 1.3.2 Další klinické postupy u malignit

Pokud dojde k operaci a je zjištěn karcinom, je pacient podle výsledků definitivní pooperační histologie zařazen do kategorie dle TNM systému a je zvolen vhodný následující postup.

Tab. 1.2: TNM klasifikace zhoubných nádorů štítné žlázy (8. edice). O velikosti a rozsahu primárního nádoru vypovídá T (tumor), o metastázách v regionálních mízních uzlinách N (nodus) a o vzdálených metastázách M (metastase) (K. Kopečková, 2019a).

<b>T0</b>	Primární karcinom nenalezen
<b>T1a</b>	Nádor ≤10 mm
<b>T1b</b>	Nádor 11–20 mm
<b>T2</b>	Primární tumor 21–40 mm, omezen na štítnou žlázu
<b>T3a</b>	Nádor větší než 40 mm v největším rozměru, omezen na štítnou žlázu
<b>T3b</b>	Nádor různé velikosti s makroskopickým šířením mimo štítnou žlázu postihující pouze páskové svaly
<b>T4a</b>	Nádor jakékoliv velikosti, šíří se mimo pouzdro štítné žlázy a postihuje jakoukoliv ze struktur: podkoží, hrtan, průdušnice, jícen, zvrtný nerv
<b>T4b</b>	Nádor postihuje prevertebrální fascii, cévy mezihrudí, obrůstá krkavici

<b>N0</b>	Spádové uzliny bez nádorové infiltrace
<b>N1a</b>	Metastázy uzlin etáže VI nebo VII (v LU pretracheálních, paratracheálních, prelaryngeálních a uzliny delfské), jednostranné či oboustranné
<b>N1b</b>	Jiné uzliny jednostranné, oboustranné, druhostranné či horní mediastinální na straně primárního tumoru (etáže I, II, III, IV, V) nebo retrofaryngeální
<b>M0</b>	Vzdálené metastázy nezjištěny
<b>M1</b>	Vzdálené metastázy nalezeny

Tab. 1.3: Prognostická stadia pro PTC a FTC dle TNM systému. Hraniční věk horší prognózy byl dle osmého vydání klasifikace TNM zvýšen na 55 let (J. Brierley et al., 2017).

<b>Pacienti mladší 55 let</b>			
Stadium I	Jakékoliv T	Jakékoliv N	M0
Stadium II	Jakékoliv T	Jakékoliv N	M1
<b>Pacienti starší 55 let</b>			
Stadium I	T1a, T1b, T2	N0	M0
Stadium II	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium III	T4a	Jakékoliv N	M0
Stadium IVA	T4b	Jakékoliv N	M0
Stadium IVB	Jakékoliv T	Jakékoliv N	M1

Jelikož se metastazování do spádových lymfatických uzlin vyskytuje téměř u poloviny pacientů s papilokarcinomem, podléhá ultrasonografickému předoperačnímu posouzení štítná žláza, a právě i mizní uzliny. Standardním chirurgickým zákrokem pro uzly podezřelé z DTC je totální tyreoidektomie (TTE). Od této možnosti se upouští pouze v případě solitárního uzlu do 1 cm bez suspektních lokálních či distálních metastáz, kdy bývá operace méně radikální. U této kategorie se většinou nepřistupuje ani k pooperačnímu podávání radiojodu. Naopak u kategorie T3 a T4 nebo jakékoliv T, N1/M1 je pooperační léčba radiojodem nezbytná. U skupiny T1b a T2N0M0 je stále radiojodová terapie velmi diskutovaným tématem, jsou zde pochybnosti, zda by ji neměli podstupovat pouze vybraní pacienti (P. Vlček, 2011). Dochází při ní k vychytávání radioaktivního jódu  $^{131}\text{I}$  z krve nádorovými buňkami, a tak i k jejich vnitřnímu ozáření. Terapie radiojodem se uplatňuje kvůli destrukci zbytků štítné žlázy po TTE, což vede ke snížení míry recidiv a mortality. Důležité je zdůraznit, že jeho podávání nelze uplatnit u MTC a ATC – zde je základním řešením operace, zmenšení těchto forem TC je dosažitelné zevním ozářením, u ATC i chemoterapií (J. Jiskra, 2011b).



Po totální tyreoidektomii je též nutno sledovat sérovou hladinu vápníku, u jedné třetiny pacientů přetrvává déle než 3 měsíce od provedení zákroku hypokalcemie – u těchto případů se podává zvýšené množství vápníků spolu s derivátem vitaminu D (P. Vlček, 2011). Je-li po chirurgickém zákroku potřebná radiojodová terapie, je u pacienta pro lepší vychytávání radiojodu zbylými tyreoidálními buňkami navozena hypotyreóza, a to podáváním rekombinantního humánního tyreostimulačního hormonu (rhTSH) nebo vysazením levothyroxinu. Hormonální léčba je u TC nezbytná a doživotní. Při vysokém riziku recidivy se levothyroxin podává v supresních dávkách, dochází k potlačení produkce TSH hypothalamo-hypofyzárním systémem (TSH nestimuluje růst suspektních buněk), v případech remise je nutné ho užívat alespoň v substitučních dávkách jako náhradu tyreoidálních hormonů (P. Vlček, 2015). Při léčbě TC se chemoterapie využívá pouze v ojedinělých případech, a to u pacientů s rychlou progresí onemocnění nebo v případě, že nádorové buňky neakumulují radiojod (A. Jurečková, 2016).

#### 1.4 Mutace související s TC

Největší podíl na vývoji rakovinného bujení mají proto-onkogeny a tumor-supresorové geny. Tyto dvě skupiny genů působí proti sobě, první zmíněné růst karcinomu aktivují, druhé inhibují. Proto-onkogeny řídí buněčnou proliferaci, která je do určité míry přínosná kvůli obnově epitelu, tvorbě pohlavních buněk aj. Je-li proto-onkogen zmutován, může dojít k jeho aktivaci a stává se onkogenem. Typicky do této skupiny patří cykliny, cyklin dependentní kinasy, růstové faktory a jejich receptory. Tumor-supresory (antionkogeny) naopak podněcují tvorbu proteinů, jejichž úkolem je buněčnou proliferaci snižovat a stimulovat apoptózu (V. Petr, 2013).

V souvislosti s PTC dochází v 70 % k přeskupení *RET/PTC* a *NTRK* nebo k bodovým mutacím v genech *RAS* a *BRAF*. Jmenované geny kódují proteiny, které jsou součástí MAPK (mitogen-activated protein kinase) signální dráhy, jež je klíčová pro buněčnou proliferaci, diferenciaci a apoptózu. U PTC se také vyskytují mutace v promotoru *TERT* genu, které jsou společně s *BRAF* mutací spojeny s horší prognózou onemocnění. S FTC jsou spojeny především mutace *RAS* genů a přeskupení *PAX8*-



*PPAR $\gamma$* . ATC kromě již zmíněných mutací *BRAF* a *RAS* způsobují *TP53* a *CTNNB1* mutace. MTC způsobují především mutace v *RET* genu, u sporadických MTC se vyskytují i *RAS* mutace (S. Forte et al., 2015).

#### 1.4.1 *BRAF* mutace

Nejčastěji mutovaným genem u PTC je *BRAF* proto-onkogen. Ve většině případů je detekována substituce valinu za glutamát v kodonu 600 (*BRAF*<sup>V600E</sup>). U karcinomů způsobených *BRAF* mutací se snižuje efektivita terapie radiojodem, jelikož způsobuje sníženou expresi *NIS* genu kódujícího sodík-jodidový symportér zajišťující transport jodu do buňky. *BRAF* mutace se kromě PTC vyskytují i u ATC, kde se předpokládá, že mohly dediferencovat z PTC. *BRAF* mutace se s *RAS* nebo *RET/PTC* mutací obvykle neobjevuje současně, u některých pacientů se ale vyskytuje současně s *TERT* mutací (S. Forte et al., 2015; Ch. Chou et al., 2017; G. C. Penna et al., 2017).

#### 1.4.2 *TERT* mutace

U bodových mutací genu *TERT* obvykle dochází k záměně nukleotidu thyminu za cytosin v promotoru na pozici -124 nebo -146, mutace jsou nazývány *C228T* a *C250T* podle své lokalizace na chromozomu. *TERT* gen kóduje katalytickou podjednotku telomerasy. Ve zdravém organismu je telomerasa inhibována, čímž se přirozeně zkracují telomery. Proces spěje k řízení buněčné smrti s cílem zachování chromozomální integrity a genomické stability. Mutacemi vznikají sekvence pro navázání transkripčních faktorů, což vede k nadměrné expresi *TERT* genu. Například v jednom z nedávných výzkumů byl vyhodnocen soubor 469 pacientů trpících TC, přičemž *TERT* mutace byla prokázána u 7,5 % PTC, 17,1 % FTC, 29 % PDTC a 33,3 % ATC. Je spojována s distálními metastázemi, horší prognózou a vyšší mortalitou DTC (G. C. Penna et al., 2017).

### 1.4.3 *RET* mutace

Proto-onkogen *RET* má více typů mutací. U PTC dochází k tzv. *RET/PTC* přeskupení, z více jak 90 % se jedná o typy *RET/PTC1* a *RET/PTC3*. Dochází k dvouřetězcovému zlomu *RET* genu a fúzi aktivační *RET* tyrosin kinázové domény s jiným genem poskytujícím promotor a dimerizační funkci. Dojde tak k vytvoření fuzního proteinu a k aktivaci *RET* tyrosin kinázové domény v cytoplazmě buněk. Některé studie spojují *RET/PTC3* s agresivnějším průběhem a výskytem u dětí ozářených při Černobylské havárii (S. Forte et al., 2015; Ch. Chou et al., 2017; G. C. Penna et al., 2017). U MTC se naopak vyskytují bodové mutace, které vedou k familiární (zárodečné mutace) nebo sporadické formě MTC (somatické mutace).

### 1.4.4 *RAS* mutace

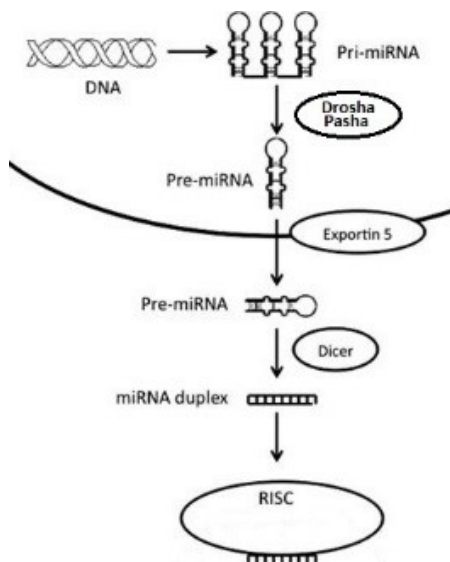
*RAS* onkogen ovlivňuje dvě důležité signalizační dráhy, a to MAP kinasovou a PI3K/Akt. Mutace se vyskytují ve 12., 13. nebo 61. kodonu *HRAS*, *KRAS* nebo *NRAS* genu. Tyto mutace se vyskytují u benigních i maligních nádorů štítné žlázy, u DTC převažuje výskyt u FTC a fvPTC (folikulární varianta PTC) nad cPTC (klasická varianta PTC), objevují se také u PDTC a ATC. U PTC je nejčastější mutace v 61. kodonu *NRAS* genu (G. C. Penna et al., 2017). Mutace způsobují stabilizaci aktivní formy proteinu a tím stimulaci signálních drah (S. Forte et al., 2015).

## 1.5 MicroRNA a její význam v diagnostice a terapii TC

MicroRNA jsou endogenní jednořetězcové molekuly o 18 až 25 nukleotidech. Nepatří sice mezi protein-kódující geny, zato přislíbují diagnostický a terapeutický přínos. Odhaduje se, že miRNA by mohly regulovat až polovinu kódujících genů lidského genomu s tím, že každá miRNA může ovlivňovat řádově až stovky mRNA. MiRNA mají významné postavení při základních procesech jako je vývoj, diferenciace, proliferace, apoptóza. Dále pak ovlivňují vlastnosti kmenových buněk, imunitní systém či nádorová bujení (O. Slabý, 2012). Genová exprese je ovlivňována přímo, v post-transkripční fázi.

K tomu nejčastěji dochází vazbou k nepřekládanému konci 3'UTR komplementární mRNA (A. Wójcicka et al., 2016).

Biogenetická dráha miRNA začíná v jádře, kde je miRNA gen pomocí RNA polymerázy II/III přepsán do primárního transkriptu miRNA, zkráceně pri-miRNA (může dosahovat velikosti na 1000 nukleotidů). Tato nově vzniklá molekula je dále štěpena komplexem enzymů Drosha-Pasha na vlásenky pre-miRNA (tzn. prekurzorové miRNA, obvykle o 60 až 120 nukleotidech) a transportována přenašečem Exportin 5 do cytoplasmy. Zde dochází ke katalýze pomocí Diceru za vzniku duplexu dvou vláken nukleových kyselin, z nichž jedno podléhá destrukci a druhé je zapojeno do RISC (J. Winter et al., 2009; Y. Zhang et al., 2013). V tomto komplexu tvořeném proteiny argonautové rodiny je 5' konec miRNA navázán přes fosfát k PIWI doméně RISC, 3' konec s dvounukleotidovým přesahem k PAZ doméně (L. Cerutti et al., 2000).



Obr. 1.4: Biogeneze miRNA (převzato a upraveno z: <http://iovs.arvojournals.org>)

Podle míry komplementarity s mRNA může dojít k inhibici její translace nebo přímo k degradaci. Aby došlo k druhé jmenované situaci, musí být komplementarita úplná, dochází pak k deadenylaci polyA 3' konce, odštěpení 7-methylguanosinové čepičky na 5' konci nebo k exonukleotickému štěpení mRNA (R. W. Carthew et al., 2009). Zátěžové podmínky mohou vyvolat i opačný jev – zvýšenou translaci mRNA v důsledku kaskády mechanismů (S. Vasudevan et al., 2007).

Soupis objevených miRNA je veden v databázi miR-Base. miRNA byla poprvé zaznamenána roku 1993 u hlístice *Caenorhabditis elegans*, jelikož gen *lin-4* nekódoval protein, ale vytvářel vlákno RNA o 22 nukleotidech podílející se na tlumení translace genu *lin-14* v důsledku interakce s příslušným genem (O. Slabý, 2012). Různé molekuly miRNA jsou velmi specifické svým expresním profilem pro rozličné formy karcinomů, některé jsou spjaté až s metastatickými fázemi rakoviny a mohou tak mít i prognostický význam. Momentálně je známo na 2000 miRNA, ale vzhledem k jejich stoupající popularitě na poli výzkumu toto číslo vzrůstá, existují dnes biotechnologické společnosti soustředící se na diagnostiku výhradně pomocí miRNA. Předpokládá se, že 50 % genů z lidského genomu spjatých s vývojem rakovinného onemocnění je ovlivňováno působením miRNA. Nabízí se možnosti, že malignitu by mohly způsobovat koincidence mezi genovými mutacemi nebo by daná miRNA mohla být markerem pro více poddruhů zhoubných nádorů (O. Slabý, 2012; S. Forte et al., 2015). Klinicky významné miRNA pro skupinu tyreoidálních malignit udává Tab. 1.4, v posledním sloupci je též zapsáno v souvislosti, s kterými mutovanými geny bývají spojovány (A. Wójcicka et al., 2016).

Tab. 1.4: Nejčastěji zkoumané miRNA v souvislosti s TC (S. Forte et al., 2015; A. Wójcicka et al., 2016).

Typ karcinomu	miRNA	Gen
<b>PTC</b>	miR-146, miR-181, miR -221/222	<i>RET/PTC, NTRK, RAS, BRAF</i>
<b>FTC</b>	miR-181, miR-199, miR-200	<i>RAS, PAX8-PPAR<math>\gamma</math></i>
<b>ATC</b>	miR-let-7, miR-17, miR-29, miR-30, miR-221/222	<i>TP53, CTNNB1, RAS, BRAF</i>

## 1.6 Metody užívané k analýze tkáně na molekulární úrovni

K rozboru buněk na molekulární úrovni se může použít lidský vzorek získaný z krevního séra/plazmy, ze zmražených tkání, pomocí biopsie tenkou jehlou nebo z nátěru buněk na cytologickém sklíčku. Zásadním krokem je zvolit metodu (chemickou nebo fyzikální) k izolaci celkové DNA a RNA. Nejužívanějšími metodami analýzy RNA jsou čipové (microarrays), PCR (kvantitativní – qPCR, digitální – dPCR) a metody založené na sekvenování nové generace (NGS) (Lab Guide, 2014a; M. Celano et al., 2017).

Při čipové analýze je na skleněné nebo plastové destičce zakotvena sonda o známé sekvenci, na níž se kovalentně váže díky komplementaritě bází jednovláknová nukleová kyselina značená fluorescenční (nebo radioaktivní) látkou. Výsledkem bývá semikvantitativní vyhodnocení hladiny mRNA interagujících se sondou po prosvícení čipu laserem. Analýza je rychlá a relativně levná v porovnání s ostatními metodami, zároveň je také nejméně citlivá a specifická (B. Tichý et al., 2004; Lab Guide, 2014b; M. Celano et al., 2017; Wikiskripta, 2018).

V poslední době se nejvíce setkáme s qPCR, kdy se v průběhu reakce sleduje množství specifické sekvence DNA v reakční směsi (Real Time PCR – PCR v reálném čase). V kombinaci s reverzní transkripcí (přepisem RNA na cDNA) navíc slouží jako vhodný nástroj analyzující genovou expresi. Tato metoda je o poznání citlivější a specifitější než microarrays.

Analýza pomocí dPCR je ještě citlivější. Jako jediná z uvedených metod umožňuje absolutní kvantifikaci cílových molekul. Vzorek je během reakce rozdělen na několik dílčích mikrofrakcí, v nichž se nalézá vždy pouze jedna až dvě molekuly. Dojde tak k získání tisíců jednotlivých výsledků, které se vyhodnotí nezávisle na počtu cyklů narozdíl od qPCR (R. Hrstka et al., 2014; M. Celano et al., 2017).

Metodika založená na sekvenování nové generace přináší o RNA nejvíce informací, což je úměrné i její značné finanční náročnosti. Dochází k mnohačetnému sekvenování milionů fragmentů o délce desítek až stovek bází současně, na paralelní úrovni. Výsledkem je jak semikvantitativní analýza, tak zjištění sekvence analyzované RNA včetně případných mutací (Lab Guide, 2014a).

## 2 Cíle práce

Hlavním cílem bakalářské práce je zavedení detekce míry exprese miRNA ze vzorků biopsií pacientů s onemocněním štítné žlázy. Optimalizací metody reverzní transkripce následované RT-qPCR je umožněn výpočet normalizované míry exprese miR-146b a miR-221. Dalšími cíli je získané hodnoty porovnat s ohledem na zařazení do Bethesda kategorií, histologickém ověření (ne)přítomnosti nádoru, detekci mutací; statistickým zpracováním signifikovat skupiny s významně rozdílnou expresí a stanovená data porovnat s poznatky světové literatury.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Přístroje

Laminární box Hera Safe KS12, Kendro (Německo)

Laminární box SCR-2A1, Esco Micro (Singapur)

Centrifuga 5415D, Eppendorf (Německo)

Centrifuga MyFuge C1012-E Mini, Benchmark Scientific (USA)

Vortex Lab Dance, IKA-WERKE (Německo)

Vortex MS2 Minishaker, IKA-WORKS (USA)

Centrifuga LMC-3000, Biosan (Litva)

Termocykler LC 480, Roche (Švýcarsko)

Termocykler T100, Bio-Rad (USA)

Termocykler TOne 96G, Biometra (Německo)

Hybridizační pec RPN2510, Amersham Pharmacia Biotech LTD (Velká Británie)

Třepačka RH201, Perkin-Elmer (USA)

### 3.2 Chemikálie

AllPrep DNA/RNA Micro Kit, Qiagen (Německo)

Ethanol 96%, Fagron (Belgie)

Merkaptoethanol 99%, Fluka (Švýcarsko)

Aqua pro injectione, Braun (Německo)

RNAsin Plus RNase Inhibitor, Promega (USA)

Random Primers, Promega (USA)

AMV Reverse Transcriptase, Promega (USA)

TaqMan Advanced microRNA Assays, Thermo Fisher Scientific (USA)

TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher Scientific (USA)

iQ SYBR Green Supermix, BioRad (USA)

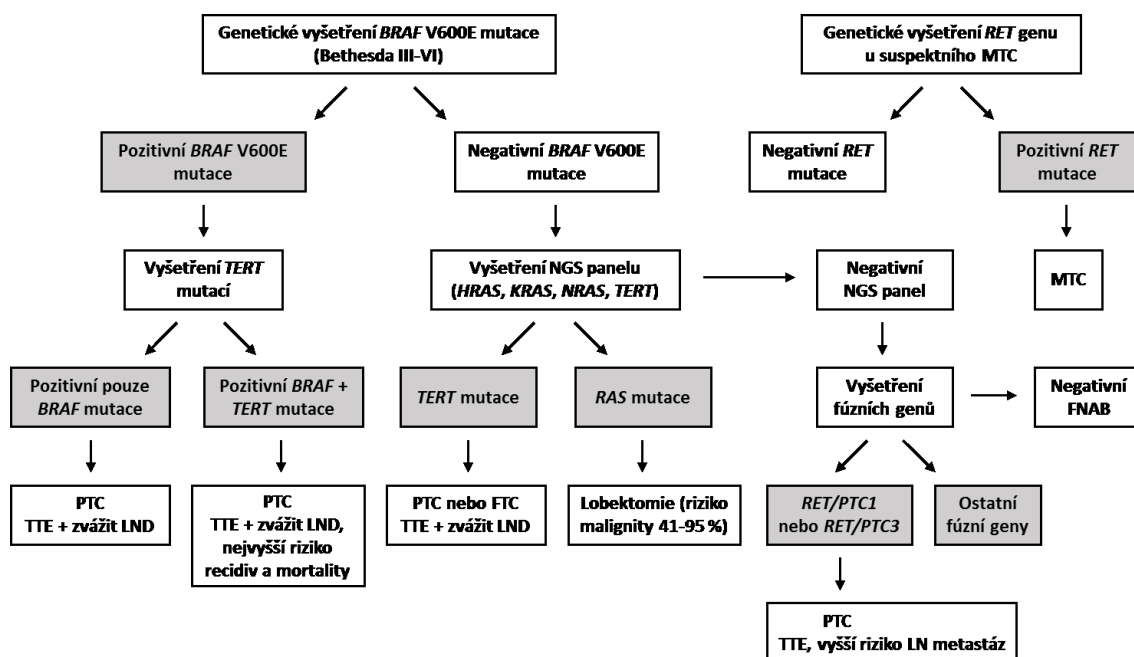
### 3.3 Soubor

Analyzován byl soubor 53 vzorků získaných od pacientů v rámci odběru tkáně na rutinní genetická vyšetření. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas s rutinní analýzou a použitím vzorku na výzkum, odběry byly prováděny v Praze v Endokrinologickém ústavu a ve Fakultní nemocnici Královské Vinohrady.

Ve většině případů (47) byly FNAB odebírány do RNA lateru, stabilizačního media s ochranou funkcí genetického materiálu. Pro tento soubor tvořený 36 ženami a 11 muži o průměrném věku 52 let (věkový interval 25 až 82 let) jsou známe údaje týkající se cytologie, přítomnosti mutací a histologie v případě operace. Pro tuto práci byla využita RNA, která byla izolovaná během rutinní genetické analýzy FNAB.

V šesti případech bylo pracováno s RNA z vysušených cytologických nátěrů, průběh izolace RNA je popsán v oddílu 3.4 (Obr. 3.1, str. 27).





Obr. 3.1: Schéma současného postupu při rutinním genetickém vyšetření. TTE – totální tyreoidektomie, LND – disekce lymfatických uzlin, LN – lymfatické uzliny (K. Kopečková, 2019b).

### 3.4 Izolace genetického materiálu z FNAB z cytologických sklíček

Před samotnou izolací RNA a DNA, jejímž cílem je získat čistý genetický materiál zbavený bílkovin a dalších amplifikaci narušujících kontaminantů, se cytologické nátěry homogenizují. Buněčný materiál získaný FNAB se nejprve smáčí 700  $\mu$ l RLT pufru s přídavkem 7  $\mu$ l merkaptoethanolu a skalpelem či pipetou převádí nejprve do falkonky, poté do 1,5ml zkumavky, vortexuje a inkubuje při pokojové teplotě tak dlouho, aby proběhla lyzace (15 až 60 min). Vzorek se zcentrifuguje (3 min, max. rychlost), supernatant se přepipetuje na kolonku (AllPrep DNA spin column) a stáčí (30 s, 8000 g). Kolonka se přendá do nové 2ml zkumavky a eluát se využije k izolaci RNA.

Ethanolu (skladován při -20 °C) se přidá množství odpovídající 1,5násobku objemu eluátu (zde většinou 600  $\mu$ l na 400  $\mu$ l eluátu). Roztok i se sraženinami se převede na kolonku RNasy MinElute po objemech max. 700  $\mu$ l, mezi přídavky vždy stáčení (30 s, 8000 g) a odstranění proteklého. Na kolonku se přidá 500  $\mu$ l RPE pufru a stočí se (30 s, 8000 g), odstraní proteklé, opět přidá 500  $\mu$ l RPE pufru, stočí se (2 min, 8000 g), odstraní

proteklé. Kolonka se umístí do nové 1,5ml zkumavky, otevřená se stočí (5 min, max. rychlost), dá se do nové 1,5ml zkumavky a na střed kolonky se nanese 14  $\mu$ l RNase free vody. Zavřená se inkubuje 10 min a stáčí (1 min, max. rychlost). Z eluátu s vyizolovanou RNA se odeberou 2  $\mu$ l do 0,5ml zkumavky a uloží do mrazáku (-20 °C) na kontrolní měření koncentrace a kvality pomocí bioanalyzátoru Agilent 2100. Zbylá RNA se uskladní v hlubokomrazicím boxu.

Na AllPrep DNA kolonku se přidá 500  $\mu$ l AW1 pufru, stočí se (30 s, 8000 g), odstraní proteklé, přidá 500  $\mu$ l AW2 pufru, stočí se (2 min, max. rychlost). Kolonka se umístí do nové 1,5ml zkumavky, připipetuje se na ni 30  $\mu$ l EB pufru (předehřátého na 70 °C), inkubuje 10 min za laboratorní teploty a stáčí (1 min, 8000 g). DNA je izolována a může být uskladněna v kryozkumavkách v lednici.

Po celou dobu homogenizačního a izolačního procesu je důležitá sterilita. Z důvodu zamezení kontaminace RNasami a následné degradaci RNA se proto pracovalo v laminárním boxu a nitrilových rukavicích, rovněž pracovní předměty – skalpel, pipety, zkumavky, separační kolonky aj. – podléhaly sterilizačním normám.

### 3.5 Reverzní transkripce

Provedení PCR je možné pouze s dvouvláknovou molekulou DNA. Proto jí předchází reverzní transkripce, během níž je genetická informace z RNA přepsána právě do komplementární DNA (cDNA) pomocí reverzní transkriptasy. Nejčastěji se k amplifikaci cDNA používají univerzální nebo náhodné primery.

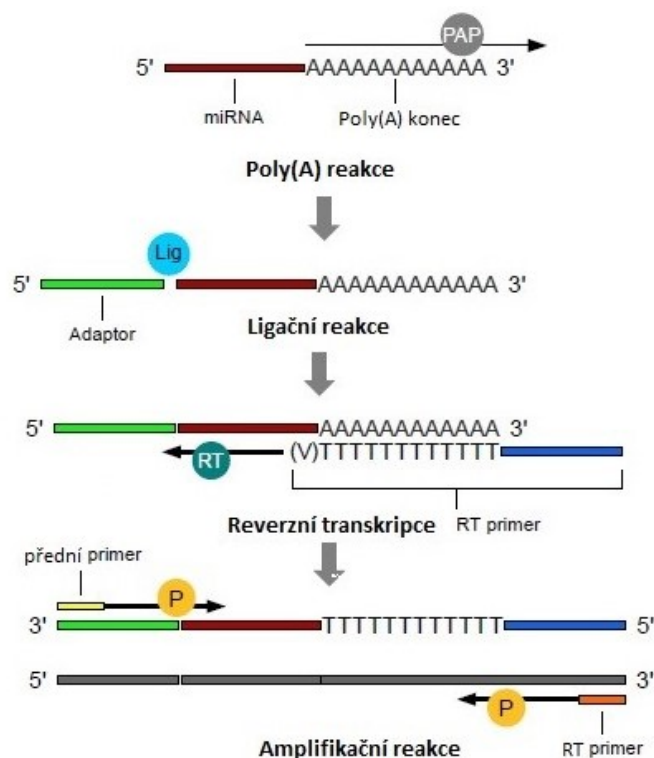
Jako univerzální primery slouží směs oligo nukleotidů (oligo dT). Takové primery nasednou na 3'poly(A) konec, od něhož začíná reverzní transkripce, cDNA poté slouží jako templát pro PCR. Tato metoda je vhodná, pokud máme dostatečně kvalitní nedegradovanou mRNA.

Náhodné (random) primery jsou nukleotidy o délce šest až devět bází (v našem případě byly použity hexadeoxynukleotidy), které nasedají na RNA vlákno náhodně. Vzniká rozmanitý soubor cDNA, přepisy pochází ze všech přítomných RNA (rRNA,

tRNA, mRNA aj.). Tyto primery jsou použitelné i na RNA, která může být částečně degradovaná. Navíc vznikne univerzální směs cDNA, která je použitelná na detekci různých mRNA.

Dále je možné použít specifické primery, které jsou určené jen pro konkrétní gen a výslednou cDNA tak nelze použít na detekci dalších mRNA.

U reverzní transkripce miRNA je třeba použít specifický postup, protože se jedná o velmi krátké molekuly, které nelze běžným postupem na Real Time PCR detekovat. Na Obr. 3.2 je námi použitý postup, který několika kroky vede k začlenění miRNA do delšího vlákna cDNA s adaptorem a RT primerem na koncích. Nevýhodou této metodiky je, že k detekci je nutné použít jen reagentie, které sekvence adaptoru a RT primeru při amplifikační reakci během Real Time PCR používají. Nevznikne tak univerzální směs cDNA, ale směs upravených cDNA, které je možné detekovat jen s návaznými produkty od stejného výrobce.



Obr. 3.2: Průběh reverzní transkripce miRNA. Nejprve probíhá ve směsi s RNA polyadenylační reakce, poly(A)polymerasa (PAP) připojí k miRNA 3' poly(A) konec, dále se na 5' konec naváže ligační adaptor jako primer pro přední univerzální primer potřebný k amplifikaci a na 3' poly(A) konec se naváže univerzální RT primer, čímž se nastartuje reverzní transkripce. Během amplifikace dochází k syntéze cDNA v obou směrech (Převzato a upraveno z: <https://www.thermofisher.com>).

### 3.5.1 Reverzní transkripce RNA

Do 200 $\mu$ l zkumavek byly pipetovány vybrané vzorky RNA a 500 $\mu$ g/ml Random Primers v množstvích 5 a 1  $\mu$ l – všechny reagenty byly před pipetováním i po jejich smísení zvortexovány, stočeny, během práce byly uchovávány na ledě. Poté byly při 70 °C po dobu 5 min inkubovány.

Pro přípravu reakční směsi (master mix) byly do 1,5ml zkumavky pipetovány látky v odpovídajících množstvích dle Tab. 3.1, před pipetováním byly rovněž zvortexovány, stočeny a uchovávány na ledě. Master mix (7  $\mu$ l) byl napipetován k RNA s primery (6  $\mu$ l), zvortexován, zcentrifugován a následně inkubován 60 min při 37 °C, čímž byla k detekci mRNA získána potřebná cDNA.

Tab. 3.1: Složení master mixu k reverzní transkripci.

	<i>V</i> [ $\mu$ l]
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1,9
<b>AMW RT 5x Buffer</b>	2,6
<b>10mM dNTPs</b>	1,4
<b>40<math>\mu</math>/ml RNasin Plus RNase Inhibitor</b>	0,5
<b>25<math>\mu</math>/ml AMW Reverse Transcriptase</b>	0,6
<b>Celkový objem</b>	7

### 3.5.2 Reverzní transkripce miRNA

Příprava cDNA z miRNA probíhala ve více krocích (Obr. 3.2), prvním z nich byla polyadenylační reakce. Master mix poly(A) reakce byl připraven dle Tab. 3.2. Do 200 $\mu$ l zkumavek byl ke 3  $\mu$ l mixu přidán vzorek RNA o objemu 2  $\mu$ l. Poté byl v cyklu inkubován nejprve 45 min při 37 °C – to probíhala adenylace – a 10 min při 65 °C, přičemž docházelo k zastavení reakce.

Tab. 3.2: Složení master mixu pro poly(A) reakci.

	<i>V</i> [ $\mu$ l]
<b>10x Poly(A) Buffer</b>	0,5
<b>ATP</b>	0,5
<b>Poly(A) Enzyme</b>	0,3
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1,7
<b>Celkový objem</b>	3

Dále byl dle Tab. 3.3 připraven ligační reakční mix, z něhož se vždy 10  $\mu\text{l}$  přidalo k 5  $\mu\text{l}$  směsi z předchozího kroku. Ligace vzorku probíhala v termocykleru 60 min při 16 °C.

Tab. 3.3: Složení master mixu k ligaci.

	<i>V</i> [ $\mu\text{l}$ ]
<b>5x DNA Ligase Buffer</b>	3
<b>50% PEG 8000</b>	4,5
<b>25x Ligation Adaptor</b>	0,6
<b>RNA Ligase</b>	1,5
<b>H<sub>2</sub>O</b>	0,4
<b>Celkový objem</b>	10

Dle Tab. 3.4 byl pipetován reakční mix pro samotnou reverzní transkripci, 15  $\mu\text{l}$  bylo míšeno s 15  $\mu\text{l}$  směsi obsahující miRNA z předchozích kroků. Reakce probíhala opět v termocykleru, a to při 42 °C 15 min, inhibována byla 5 min za teploty navýšené na 85 °C. Reakce byla následně zchlazena na 4 °C.

Tab. 3.4: Složení master mixu pro reverzní transkripci.

	<i>V</i> [ $\mu\text{l}$ ]
<b>5x RT Buffer</b>	6
<b>dNTP Mix [25mM]</b>	1,2
<b>20x Universal RT Primer</b>	1,5
<b>10x RT Enzyme Mix</b>	3
<b>H<sub>2</sub>O</b>	3,3
<b>Celkový objem</b>	15

Než mohly vzorky podléhat qPCR-RT, proběhla ještě jejich amplifikace. Master mix pro tuto reakci byl připraven podle Tab. 3.5, k jeho 45  $\mu\text{l}$  bylo přidáno vždy 5  $\mu\text{l}$  transkribovaného vzorku. Amplifikace se konala za podmínek viz Tab. 3.6.

Tab. 3.5: Složení master mixu pro amplifikaci.

	<i>V</i> [ $\mu\text{l}$ ]
<b>2x miR-Amp Master Mix</b>	25
<b>20x miR-Amp Primer Mix</b>	2,5
<b>H<sub>2</sub>O</b>	17,5
<b>Celkový objem</b>	45

Tab. 3.6: Podmínky amplifikace.

		Teplota [°C]	Čas	Cykly
<b>Enzymová aktivace</b>		95	5 min	1
<b>Amplifikace</b>	<b>1. Denaturace</b>	95	3 s	40
	<b>2. Annealing</b>	60	30 s	
<b>Inhibice</b>		99	10 min	1

Před přípravou reakčních mixů byly všechny reagensy vždy zvortexovány, stočeny a uchovávány na ledu. I zde se kvůli hroící kontaminaci pracovalo se sterilními špičkami s filtrem a zkumavkami v prostoru laminárního boxu. Tabulky s reagensy k přípravě master mixů uvádí vždy objem vztažený na jednu reakci (platí i pro oddíl 3.6).

### 3.6 qRT-PCR

cDNA získaná z reverzní transkripce byla amplifikována v termocykleru pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (Real Time PCR). Kvantifikace produktu byla zaznamenávána díky fluorescenčnímu signálu snímanému detektorem. Softwarem počítače byly z amplifikačních křivek vypočteny hodnoty  $C_t$  (cycle of threshold, značen též  $C_p$  – crossing point), tedy cykly, kdy došlo k prudkému nárůstu fluorescenčního záření nad práh pozadí. Tato  $C_t$  se rovnala maximu 2. derivace amplifikační křivky a závisela na počáteční koncentraci DNA ve vzorku – byla-li příliš nízká, k nárůstu fluorescence bylo nutno více amplifikačních cyklů. U kvantitativní PCR lze provádět absolutní kvantifikaci v případě, že jsou k dispozici standardy o známé koncentraci nebo relativní kvantifikaci v případě, že standardy nejsou a míra exprese je porovnávána s referenčními geny, které jsou v buňkách běžně exprimovány.

Pro cDNA transkribované pro detekci mRNA a miRNA bylo využito rozdílných detekčních principů, avšak pro oba pracovní postupy platí, že všechny master mixy byly připravovány ve sterilním prostředí PCR boxu, s chemikáliemi i vzorky bylo pracováno na ledu a každá sonda, vzorek a master mix byl před všemi pipetováními nejprve zvortexován a stočen.

### 3.6.1 Detekce *RET/PTC* přeskupení

Amplifikace probíhala za pomoci specifických primerů pro referenční gen beta-actin a *RET/PTC1* a *RET/PTC3* přeskupení. Pro detekci bylo využito barvivo SYBR Green jakožto zdroj fluorescence, které se nespecificky vmezeří do dvoušroubovicových molekul. Pro vyloučení nespecifit či primer dimerů byla na konci amplifikace zařazena analýza křivky tání.

Reakční směsi byly pipetovány do 0,5ml zkumavek dle Tab. 3.7. Vzorky cDNA byly nanášeny na destičku v duplikátech, k 18  $\mu$ l master mixu byly pipetovány v objemu 2  $\mu$ l. Na destičce byla vždy též negativní kontrola reverzní transkripce pro master mix beta-actinu, negativní kontrola PCR reakce (injekční voda) pro všechny master mixy a jako pozitivní kontrola vybrané pozitivní vzorky (vzorek 851 nebo 602 pro beta-actin, vzorek 100 pro *RET/PTC1* a vzorek 94A pro *RET/PTC3*), pozitivní kontroly byly nejdříve 5x ředěny. Po napipetování všech objemů do daných jamek, byla destička překryta speciální ochrannou folií, stočena, promíchána na třepačce a opět stočena.

Tab. 3.7: Složení master mixu za použití specifických primerů pro beta-actin, *RET/PTC1* nebo *RET/PTC3*.

	V [ $\mu$ l]
<b>IQ Syber mix 2x</b>	10
<b>10<math>\mu</math>M Primer F</b>	0,5
<b>10<math>\mu</math>M Primer R</b>	0,5
<b>H<sub>2</sub>O</b>	7
<b>Celkový objem</b>	18

Nejprve probíhala 5 min denaturace při 95 °C, poté následovalo 40 cyklů reakce dle podmínek v Tab. 3.8, při nichž docházelo k rozrušení vodíkových vazeb za vzniku jednovláknové molekuly DNA, potom se za snížené teploty na specifická místa navázaly primery. Vznikaly tak dvouvláknové úseky, na něž nasedal enzym DNA polymerasa, tato část PCR se nazývá annealing. Poslední fází je syntéza DNA, kdy DNA polymerasa produkovala za zvýšené teploty dceřiné vlákno komplementární k výchozí DNA, a to ve směru od 5' konce ke 3' konci.

Tab. 3.8: Podmínky qRT-PCR.

	Teplota [°C]	Čas	Cykly
<b>Aktivace</b>	95	5 min	1
<b>Amplifikace</b>	<b>1. Denaturace</b>	95	10 s
	<b>2. Annealing</b>	60	10 s
	<b>3. Syntéza DNA</b>	72	10 s
<b>Fáze tání</b>	94	1 min	1
<b>Zchlazení</b>	37	10 min	1

Reakce po proběhnutí 40 cyklů přešla do fáze tání, kdy byla reakce zahřívána ze 72 °C na 94 °C a probíhalo kontinuální měření fluorescence. Na závěr byla reakce zchlazena na 37 °C po dobu 10 min.

### 3.6.2 Relativní kvantifikace miRNA

Pro detekci vybraných miRNA byly použity specifické fluorescenční hydrolytické sondy TaqMan MGB (Minor Groove Binder). Jedná se nukleotidovou sekvenci s fluoroforem FAM na 5' konci a zhášecem na 3' konci. Naváže-li se specificky mezi forward a reverse primer amplifikované oblasti DNA, DNA polymerasa na sondu narazí, sondu rozštěpí a katalyticky zhášeč tak od fluoroforu oddělí, čímž dochází k emisi fluorescenčního záření.

U každého vzorku se kromě cílových miRNA miRNA-146b a miR-221 analyzovaly ještě tři referenční miR-191, miR-423 a miR-103a, které sloužily k normalizaci vzorků, aby se vyrovnaly rozdíly v kvalitě či množství genetického materiálu.

Tab. 3.9: Analyzované miRNA. Předpona hsa udává původce (zde Homo sapiens), přípona 3p a 5p značí, z jakého raménka vlásenky prekurzoru převažuje exprese uvedených miRNA.

Název	Sekvence	Chromozom
<b>hsa-miR-191-5p</b>	CAACGGAAUCCCAAAAGCAGCUG	3
<b>hsa-miR-423-5p</b>	UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU	17
<b>hsa-miR-103a-3p</b>	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	20
<b>hsa-miR-146b-5p</b>	UGAGAACUGAAUCCAUAAGGCUG	10
<b>hsa-miR-221-5p</b>	ACCUGGCAUACAAUGUAGAUAUU	X



Složení master mixů popisuje Tab. 3.10. 10x ředěné vzorky byly nanášeny na destičku v tripletech, k 15  $\mu\text{l}$  master mixu byl pipetován vzorek o objemu 5  $\mu\text{l}$ . Na destičce byla také negativní kontrola reverzní transkripce pro master mixy referenčních genů (miR-191, miR-423, miR-103a) a negativní kontrola PCR reakce (injekční voda) u referenčních i studovaných genů. Po napipetování objemů do destičky byla překryta speciální ochrannou folií, stočena, promíchána a znovu stočena, než byla vložena do cykleru. Zde probíhala PCR pouze dvoukroková, opět ve 40 cyklech, a to za podmínek uvedených v Tab. 3.11.

Tab. 3.10: Složení master mixu pro jednotlivé microRNA.

	V [ $\mu\text{l}$ ]
<b>TaqMan Fast Advanced Master Mix 2x</b>	10
<b>TaqMan Advanced miRNA Assay 20x</b>	1
<b>H<sub>2</sub>O</b>	4
<b>Celkový objem</b>	15

Tab. 3.11: Podmínky qRT-PCR.

		Teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Čas [s]	Cykly
<b>Enzymová aktivace</b>		95	20	1
<b>Amplifikace</b>	<b>1. Denaturace</b>	95	3	40
	<b>2. Annealing</b>	60	30	
<b>Zchlazení</b>		40	30	1

### 3.7 Optimalizace

Pro zhodnocení potenciální inhibice reverzní transkripce a PCR byla provedena reverzní transkripce s různě naředěnou vstupní RNA. K optimalizaci byly použity vzorky B167, B188 a B192 neředěné a ředěné 2x, 4x a 8x. K posouzení možného vlivu RNAsin inhibitoru, který brání působení RNAas, jsme u ředění 2x použily reakci bez inhibitoru a s 1  $\mu\text{l}$  inhibitoru. Reakce byla provedena pro každou referenční miRNA. Vzorky cDNA pak byly analyzované pomocí Real Time PCR v tripletech. Získané hodnoty  $C_t$  byly následně zprůměrovány, nejvíce vyhovovaly ty neředěné, působení inhibitoru se na hodnotách  $C_t$  neprojevilo, proto byly reakce prováděny s ním.

### 3.8 Účinnost reakce

K zjištění účinnosti reakce byl použit vzorek B278 s neředěnou a 10x, 100x a 1000x ředěnou cDNA (rovněž ke zpřesnění výsledku pipetován v tripletech), tak aby byla získána standardní křivka. Stejně jako hodnoty  $C_t$  byly i účinnosti reakce vypočítány softwarem LightCycleru, uvádí je Tab. 3.12.

Tab. 3.12: Přehled miRNA a účinností jejich reakcí.

	Účinnost (E)
<b>miR-191-5p</b>	2,147
<b>miR-423-5p</b>	2,136
<b>miR-103a-3p</b>	2,067
<b>miR-146b-5p</b>	2,092
<b>miR-221-5p</b>	2,237

### 3.9 Výpočet míry exprese miRNA

Hodnoty  $C_t$  byly pro každý vzorek a cílovou miRNA (miR-146b-5p a miR-221-3p) normalizovány pomocí exprese tří referenčních miRNA dle vzorce

$$\Delta C_t = \frac{\sqrt[3]{((E_{\text{miR-191}})^{C_{t\text{miR-191}}} \times (E_{\text{miR-423}})^{C_{t\text{miR-423}}} \times (E_{\text{miR-103a}})^{C_{t\text{miR-103a}}})}{(E_{\text{cíl.miR}})^{C_{t\text{cíl.miR}}}}. \quad (3.1)$$

Normalizované hodnoty sloužily ke stanovení relativní kvantifikace, která porovnává expresi miRNA vzorku vzhledem k histologicky potvrzeným benigním vzorkům. Hodnoty normalizované exprese  $\Delta C_t$  byly poděleny průměrem  $\Delta C_t$  vzorků, u nichž bylo histologicky potvrzeno, že jsou benigní (B135, B146/2, B170, B172, B179, B270, B290, B335, B379, B407, B429). Při porovnávání hodnot benigních a PTC bylo pracováno se vzorky, u nichž bylo po následné operaci histologicky potvrzeno PTC (B129, B136, B185, B197, B199, B212/1, B276, B278, B354, B355, B385, B399, B406, B416). Při porovnání hodnot  $\Delta C_t$  z hlediska mutací bylo pracováno se vzorky, u nichž byla rutinní analýzou stanovena mutace: *BRAF*<sup>V600E</sup> (B129, B136, B185, B276, B278, B350, B399, B429), pouze v jednom případě (B407) byla objevena *BRAF*<sup>V601K</sup>, která není tolik agresivní a vyskytuje se spíše u fvPTC; *NRAS*<sup>Q61R</sup> (B135, B353, B354), *NRAS*<sup>Q61K</sup> (B146/2), *KRAS*<sup>Q61K+G60G</sup> (B355) a *BRAF*<sup>V600E</sup> současně s *TERT*<sup>C228T</sup> (B197, B212/1, B248), popř. s *TERT*<sup>C250T</sup> (B416).

### 3.10 Statistické vyhodnocení

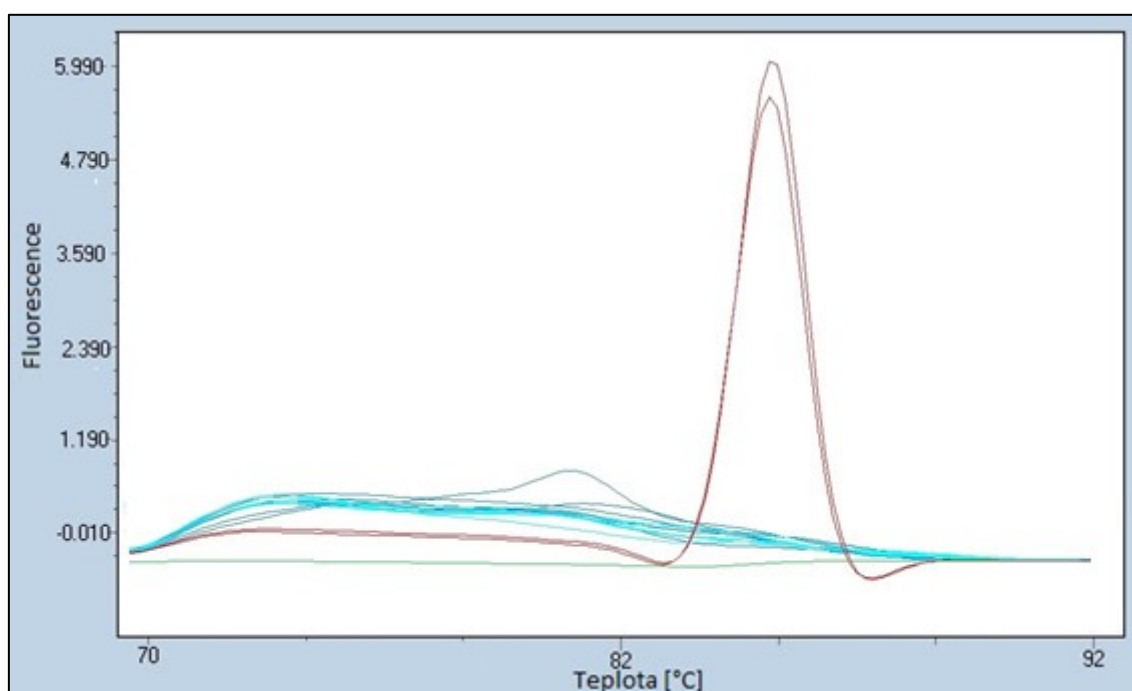
Stanovené míry exprese byly statisticky zpracovány softwarem STATGRAPHICS Centurion 18 (verze 18.02.1). K vyhodnocení byl využit Kruskal-Wallisův test. Jedná se o neparametrickou analýzu rozptylu výsledků dle mediánu, vhodná je pro porovnání dvou a více na sobě nezávislých skupin. Posuzuje shodu distribučních funkcí skupiny za předpokladu nulové hypotézy. Je-li hodnota testové statistiky menší než kritický faktor příslušné hladiny spolehlivosti, nulová hypotéza se zamítá a poukazuje na statisticky významný rozdíl porovnávané vlastnosti mezi skupinami. V tomto případě byla uvažována 95 % spolehlivost testu, míra exprese posuzovaných skupin se tudíž významně lišila, platila-li podmínka:  $P < 0,05$ .

U analýz, kde jsou porovnávány více než právě skupiny, hodnota  $P$  vypovídá o celkovém pohledu na variabilitu skupin v rámci souboru. Ke zjištění významných odlišností mezi párovými kombinacemi skupin slouží násobné testování hypotézy (lze tak stanovit jejich jednotlivá  $P$ ). Čím více skupin je porovnáváno, tím je větší pravděpodobnost statistické chyby. Proto byl Kruskal-Wallisův test ve druhém kroku (po prokázání heterogenity souboru) spojen ještě s Bonferroniho korekční procedurou. Takto byly softwarově vyhodnoceny významné rozdíly mezi vzorky dle příslušnosti k Bethesda kategoriím a v souvislosti s přítomností mutace. V grafech jsou výrazně odlišné skupiny propojeny svorkou a uvedené hodnoty  $P$  pochází z jednoduchého Kruskal-Wallisova testu (tzn. před kombinovaným testem spojeným s korekcí).

## 4 Výsledky

### 4.1 *RET/PTC* přeskupení

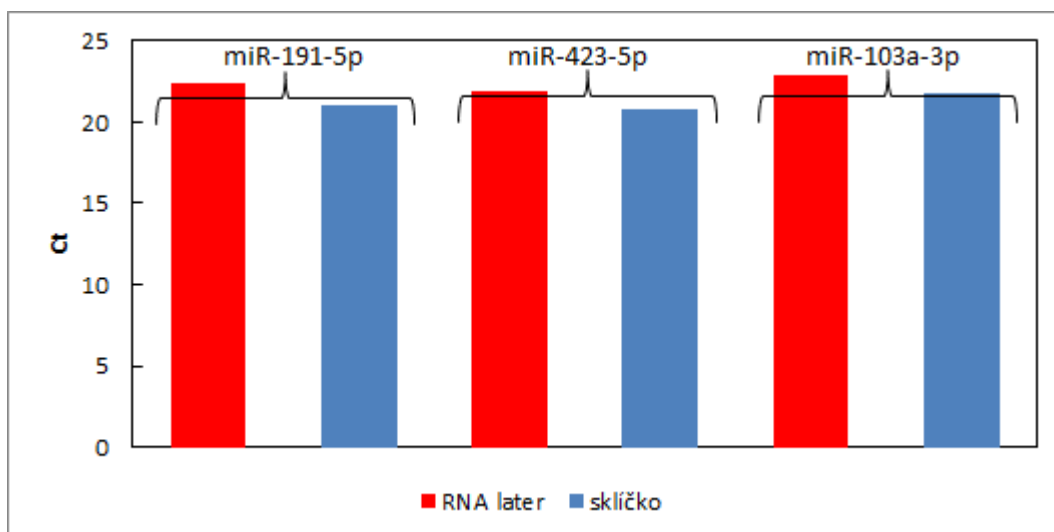
Mutace v genu *RET/PTC1* a *RET/PTC3* nebyla nalezena u žádného z 53 stanovovaných vzorků (pracováno pouze se vzorky v RNA lateru), přičemž u třech vzorků bylo  $C_t$  referenčního beta-actinu vyšší než 35, a tudíž nebyly vyhodnotitelné (nad touto hranicí neposkytuje analýza přesná  $C_t$ ). To znamená, že u těchto tří vzorků nebyla RNA ve vzorcích v dostatečném množství nebo kvalitě.



Obr. 4.1: Křivka tání ze stanovení *RET/PTC3* – červeně je znázorněna pozitivní kontrola, zeleně negativní. V případě, že by DNA vzorku byla mutována, byla by na stejném místě jako pozitivní kontrola.

### 4.2 Relativní kvantifikace miRNA

Hodnoty  $C_t$  referenčních genů pro vzorky z cytologických nátěrů vyšly obdobně jako u vzorků v RNA lateru. Kruskal-Wallisův test potvrdil, že rozdíl hodnot  $C_t$  je zanedbatelný, pro miR-146b  $P=0,472$  a pro miR-221  $P=0,714$ . Dokládá to Obr. 4.2. Metodu pro vzorky z cytologických nátěrů tedy aplikovat lze.



Obr. 4.2: Grafické porovnání hodnot  $C_t$  pro referenční miRNA za užití genetického materiálu z FNAB a cytologických nátěrů.

Tab. 4.1: Výsledky normalizované exprese pro miR-146b.

Vzorek	Bethesda	$\Delta C_t$ (146b)	$\log \Delta C_t$	Relativní exprese
B289	2	0,0063	-2,202	0,060
B352	2	0,0112	-1,950	0,108
B293	2	0,0271	-1,567	0,260
B351	2	0,0529	-1,277	0,508
B296	2	0,0610	-1,215	0,586
B295	2	0,0628	-1,202	0,604
B349	2	0,6571	-0,182	6,319
B298	2	0,7890	-0,103	7,587
B329	3	0,0081	-2,089	0,078
B194	3	0,0148	-1,829	0,143
B335	3	0,0470	-1,327	0,452
B358	3	0,0633	-1,199	0,608
B146/2	3	0,0696	-1,157	0,669
B193	3	0,1178	-0,929	1,133
B290	3	0,2230	-0,652	2,145
B240	3	0,2522	-0,598	2,425
B254	3	0,3132	-0,504	3,012
B227	3	0,5755	-0,240	5,534
B353	3	1,2983	0,113	12,48
B170	4	0,0234	-1,631	0,225
B379	4	0,0362	-1,441	0,348
B172	4	0,0609	-1,215	0,586
B212/1	4	0,0693	-1,159	0,666

<b>B179</b>	4	0,0713	-1,147	0,686
<b>B407</b>	4	0,1398	-0,854	1,345
<b>B135</b>	4	0,1409	-0,851	1,355
<b>B354</b>	4	0,7515	-0,124	7,227
<b>B256</b>	4	2,1368	0,330	20,55
<b>B185</b>	4	237,22	2,375	2281
<b>B270</b>	5	0,0167	-1,777	0,161
<b>B248</b>	5	0,0905	-1,043	0,870
<b>B431</b>	5	0,1263	-0,898	1,215
<b>B385</b>	5	0,1274	-0,895	1,225
<b>B199</b>	5	0,7300	-0,137	7,020
<b>B286</b>	5	1,4989	0,176	14,41
<b>B416</b>	5	1,8204	0,260	17,51
<b>B136</b>	5	2,1361	0,330	20,54
<b>B276</b>	5	3,3438	0,524	32,16
<b>B129</b>	5	5,2531	0,720	50,52
<b>B197</b>	5	40,320	1,606	387,7
<b>B280</b>	6	0,0144	-1,842	0,138
<b>B429</b>	6	0,3149	-0,502	3,028
<b>B399</b>	6	0,6337	-0,198	6,094
<b>B355</b>	6	4,5321	0,656	43,58
<b>B278</b>	6	8,9962	0,954	86,51
<b>B350</b>	6	36,117	1,558	347,3
<b>B406</b>	6	63,704	1,804	612,6

Tab. 4.2: Výsledky normalizované exprese pro miR-221.

<b>Vzorek</b>	<b>Bethesda</b>	<b><math>\Delta C_t</math> (221)</b>	<b><math>\log \Delta C_t</math></b>	<b>Relativní exprese</b>
<b>B352</b>	2	0,0002	-3,734	0,002
<b>B293</b>	2	0,0003	-3,590	0,003
<b>B289</b>	2	0,0003	-3,522	0,003
<b>B295</b>	2	0,0004	-3,427	0,004
<b>B349</b>	2	0,0004	-3,411	0,004
<b>B296</b>	2	0,0008	-3,085	0,008
<b>B351</b>	2	0,0012	-2,923	0,012
<b>B329</b>	3	0,0001	-3,880	0,001
<b>B254</b>	3	0,0002	-3,608	0,002
<b>B194</b>	3	0,0003	-3,564	0,003
<b>B193</b>	3	0,0003	-3,513	0,003

<b>B358</b>	3	0,0005	-3,319	0,005
<b>B335</b>	3	0,0016	-2,787	0,016
<b>B146/2</b>	3	0,0024	-2,624	0,024
<b>B290</b>	3	0,0033	-2,480	0,033
<b>B353</b>	3	0,0048	-2,320	0,047
<b>B240</b>	3	0,0171	-1,767	0,169
<b>B227</b>	3	0,0403	-1,395	0,399
<b>B212/1</b>	4	0,0004	-3,412	0,004
<b>B172</b>	4	0,0004	-3,439	0,004
<b>B179</b>	4	0,0006	-3,238	0,006
<b>B170</b>	4	0,0006	-3,225	0,006
<b>B256</b>	4	0,0012	-2,936	0,011
<b>B135</b>	4	0,0015	-2,817	0,015
<b>B379</b>	4	0,0051	-2,292	0,051
<b>B354</b>	4	0,0084	-2,075	0,083
<b>B407</b>	4	0,0190	-1,721	0,188
<b>B185</b>	4	7,0245	0,847	69,52
<b>B248</b>	5	0,0006	-3,255	0,005
<b>B276</b>	5	0,0028	-2,554	0,028
<b>B416</b>	5	0,0061	-2,214	0,060
<b>B286</b>	5	0,0092	-2,038	0,091
<b>B136</b>	5	0,0113	-1,948	0,112
<b>B199</b>	5	0,0321	-1,493	0,318
<b>B129</b>	5	0,0324	-1,489	0,321
<b>B270</b>	5	0,0904	-1,044	0,895
<b>B197</b>	5	0,4907	-0,309	4,856
<b>B280</b>	6	0,0006	-3,214	0,006
<b>B429</b>	6	0,0009	-3,069	0,008
<b>B399</b>	6	0,0021	-2,682	0,021
<b>B278</b>	6	0,0235	-1,629	0,233
<b>B350</b>	6	0,0530	-1,276	0,525
<b>B355</b>	6	0,1036	-0,985	1,025
<b>B406</b>	6	0,2217	-0,654	2,194

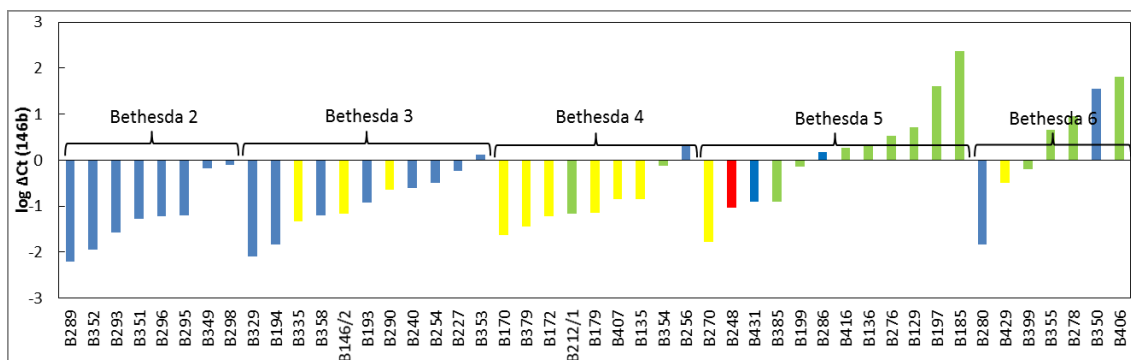
Tab. 4.3: Průměrné hodnoty  $\Delta C_t$  pro miR-146b.

	$\Delta C_t$ (146b)	Směrodatná odchylka
<b>Bethesda 2</b>	0,208	0,2996
<b>Bethesda 3</b>	0,271	0,3624
<b>Bethesda 4</b>	0,381	0,6564
<b>Bethesda 5</b>	0,212	65,073
<b>Bethesda 6</b>	0,276	22,671
<b><i>BRAF</i></b>	36,73	73,080
<b><i>RAS</i></b>	1,358	1,6485
<b><i>BRAF+TERT</i></b>	10,58	17,188
<b>Benigní</b>	0,104	0,0858
<b>PTC</b>	26,40	61,151

Tab. 4.4: Průměrné hodnoty  $\Delta C_t$  pro miR-221.

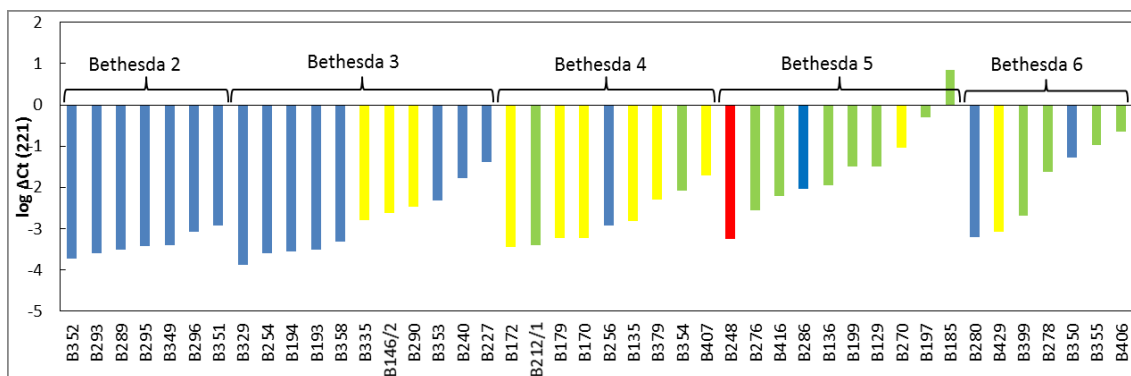
	$\Delta C_t$ (221)	Směrodatná odchylka
<b>Bethesda 2</b>	0,001	0,0003
<b>Bethesda 3</b>	0,006	0,0117
<b>Bethesda 4</b>	0,004	0,0059
<b>Bethesda 5</b>	0,770	2,0896
<b>Bethesda 6</b>	0,058	0,0754
<b><i>BRAF</i></b>	0,896	2,3164
<b><i>RAS</i></b>	0,024	0,0398
<b><i>BRAF+TERT</i></b>	0,124	0,2115
<b>Benigní</b>	0,011	0,0255
<b>PTC</b>	0,612	1,8558

#### 4.2.1 Sloupcové grafy

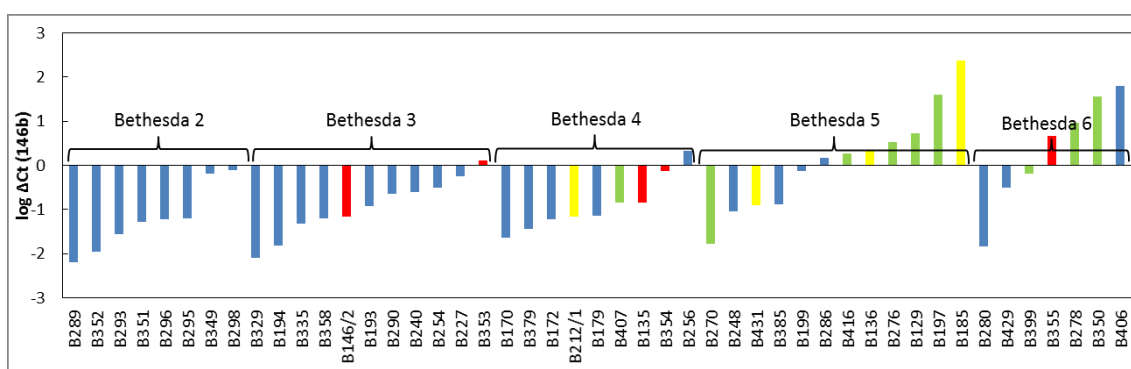


Obr. 4.3: Sloupcový graf zlogaritmovaných hodnot  $\Delta C_t$  pro miR-146b dle histologie. Žlutě vzorky benigní, zeleně s PTC, červeně melanom, modře bez histologického ověření.

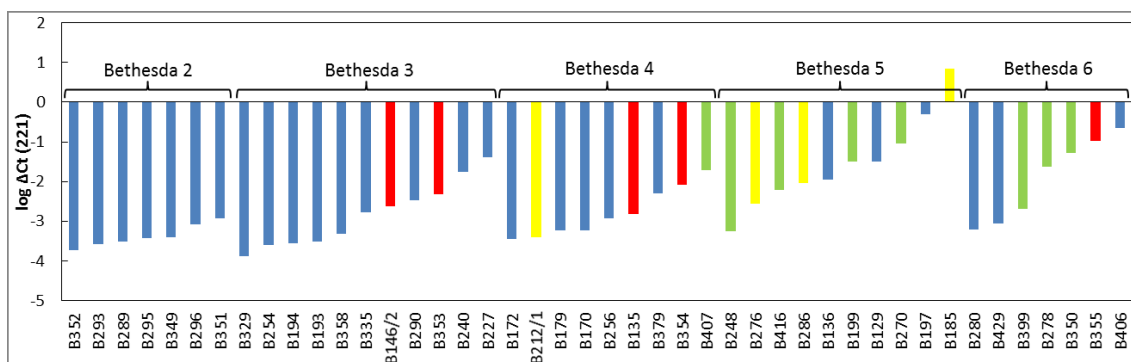




Obr. 4.4: Sloupkový graf zlogaritmovaných hodnot  $\Delta C_t$  pro miR-221 dle histologie. Žlutě vzorky benigní, zeleně s PTC, červeně melanom, modře bez histologického ověření.

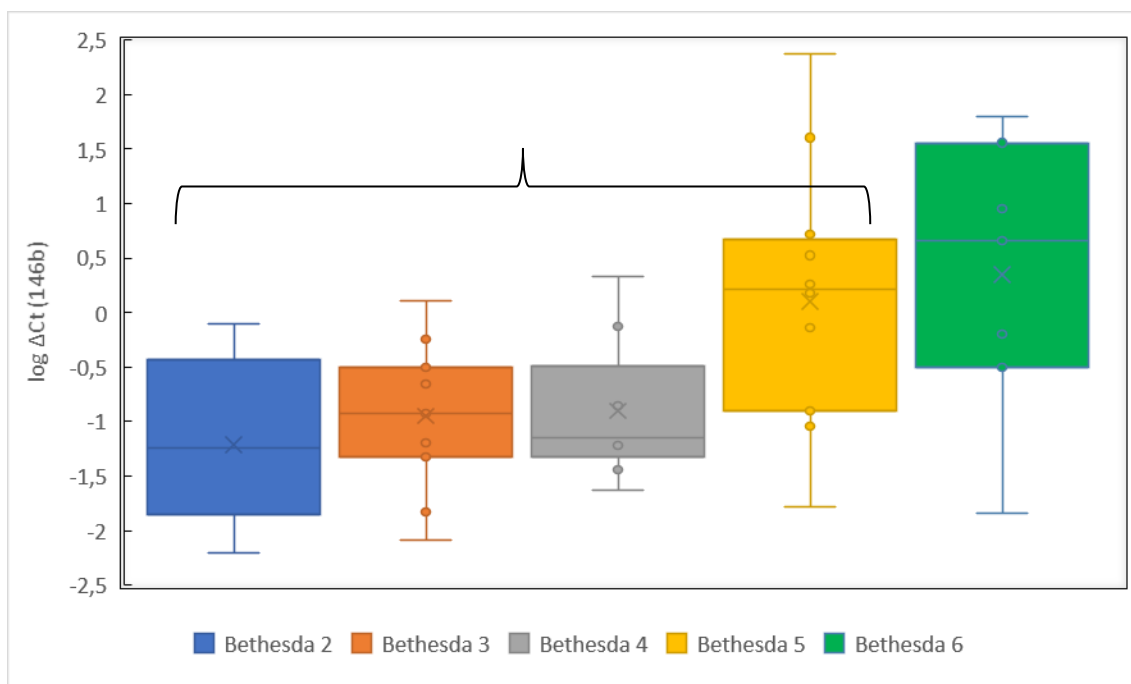


Obr. 4.5: Sloupkový graf zlogaritmovaných hodnot  $\Delta C_t$  pro miR-146b dle detekovaných mutací. Zeleně vzorky s *BRAF* mutací, žlutě mající *BRAF* i *TERT*, červeně *RAS*, modře bez nalezené mutace.

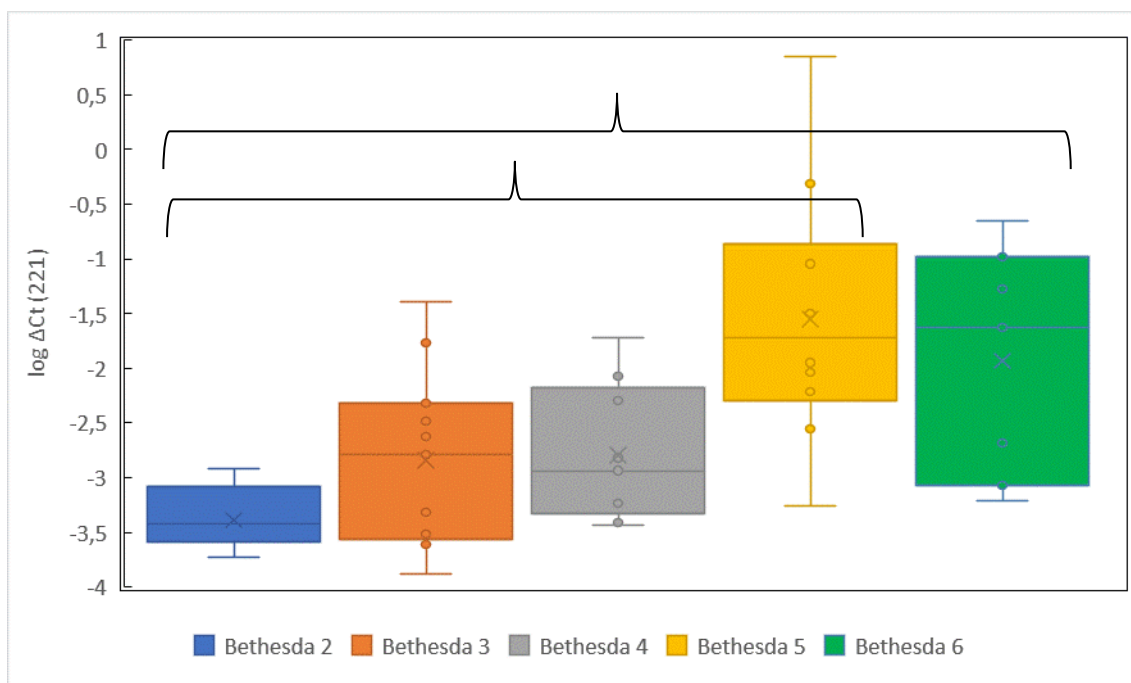


Obr. 4.6: Sloupkový graf zlogaritmovaných hodnot  $\Delta C_t$  pro miR-221 dle detekovaných mutací. Zeleně vzorky s *BRAF* mutací, žlutě mající *BRAF* i *TERT*, červeně *RAS*, modře bez nalezené mutace.

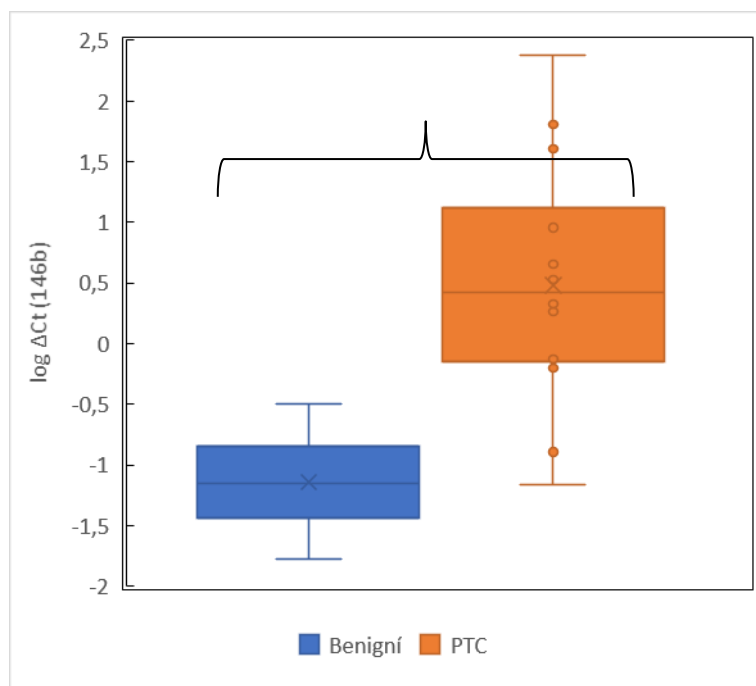
## 4.2.2 Krabicové grafy



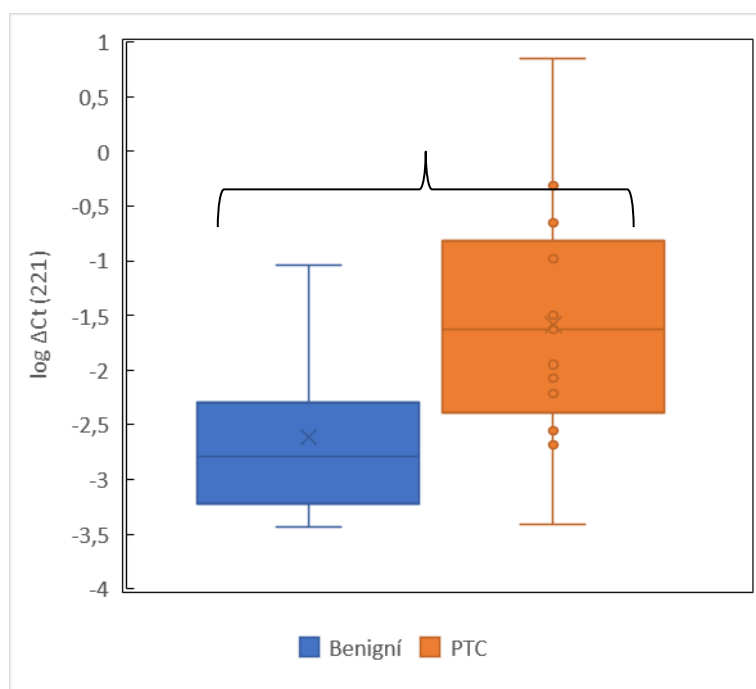
Obr. 4.7: Krabicový graf pro zlogaritmované hodnoty  $\Delta C_t$  pro miR-146b dle Bethesda. Kruskal-Wallisův test udává  $P=0,008$  (B2  $n=8$ , B3  $n=11$ , B4  $n=9$ , B5  $n=12$ , B6  $n=7$ ).



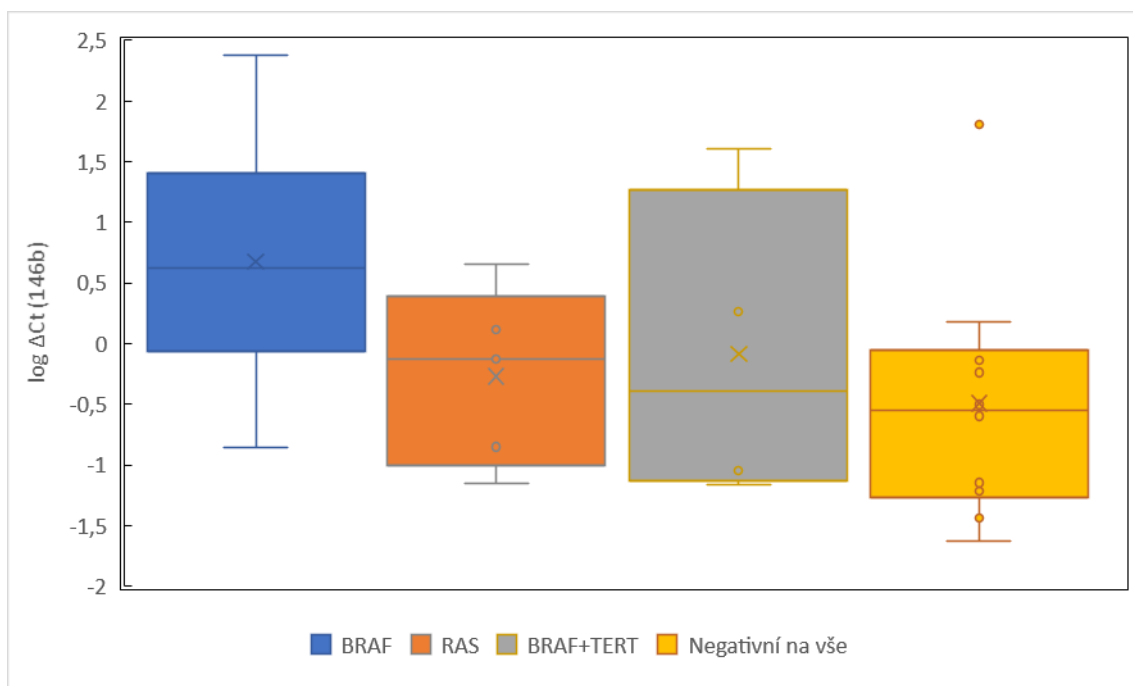
Obr. 4.8: Krabicový graf pro zlogaritmované hodnoty  $\Delta C_t$  pro miR-221 dle Bethesda kategorií. Kruskal-Wallisův test udává  $P=0,001$  (B2  $n=7$ , B3  $n=11$ , B4  $n=9$ , B5  $n=10$ , B6  $n=7$ ).



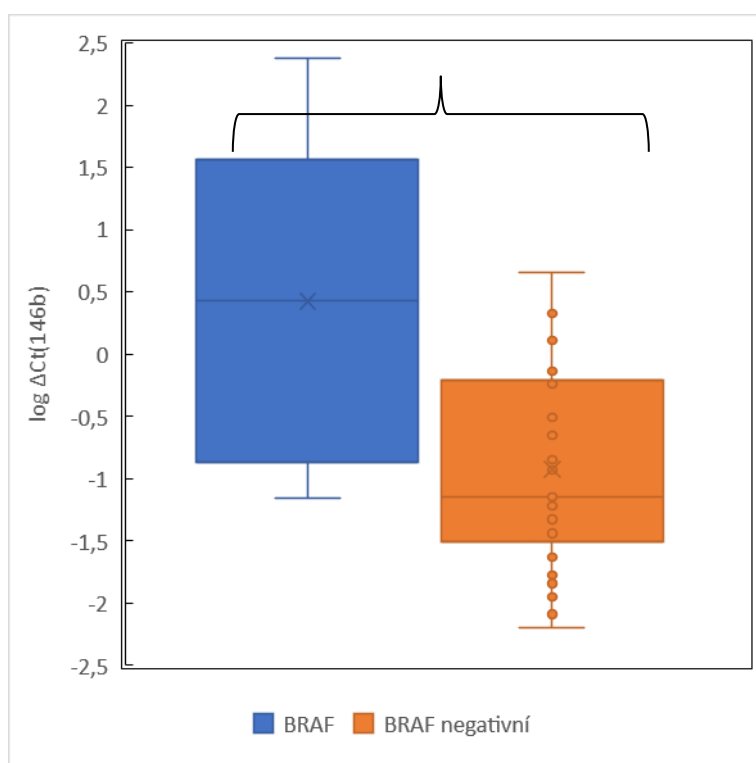
Obr. 4.9: Krabicový graf pro zlogaritmované hodnoty  $\Delta C_t$  pro miR-146b dle histologie. Kruskal-Wallisův test udává  $P=0,0002$  (benigní  $n=11$ , PTC  $n=14$ ).



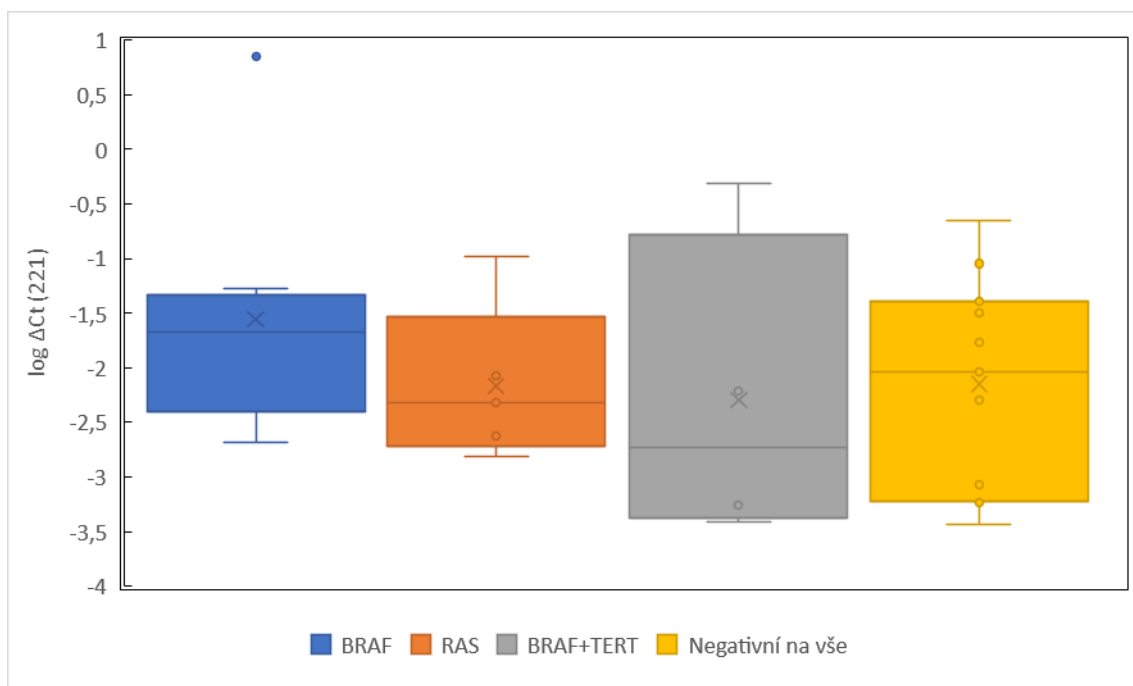
Obr. 4.10: Krabicový graf pro zlogaritmované hodnoty  $\Delta C_t$  pro miR-221 dle histologie. Kruskal-Wallisův test udává  $P=0,012$  (benigní  $n=11$ , PTC  $n=13$ ).



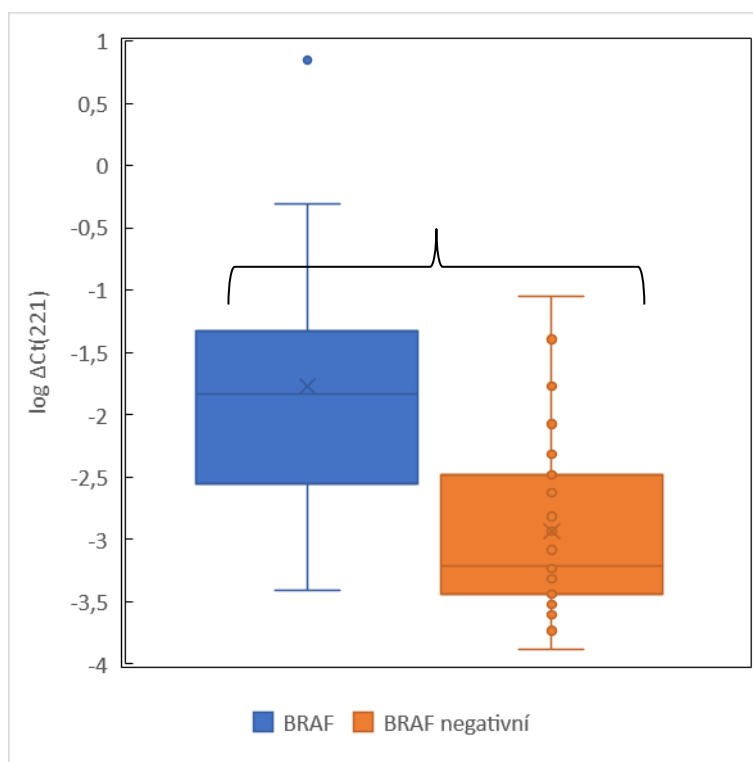
Obr. 4.11: Krabicový graf pro zlogaritmované hodnoty  $\Delta C_t$  pro miR-146b dle mutací (*BRAF*  $n=8$ , *RAS*  $n=5$ , *BRAF+TERT*  $n=4$ , negativní na mutace  $n=12$ ).



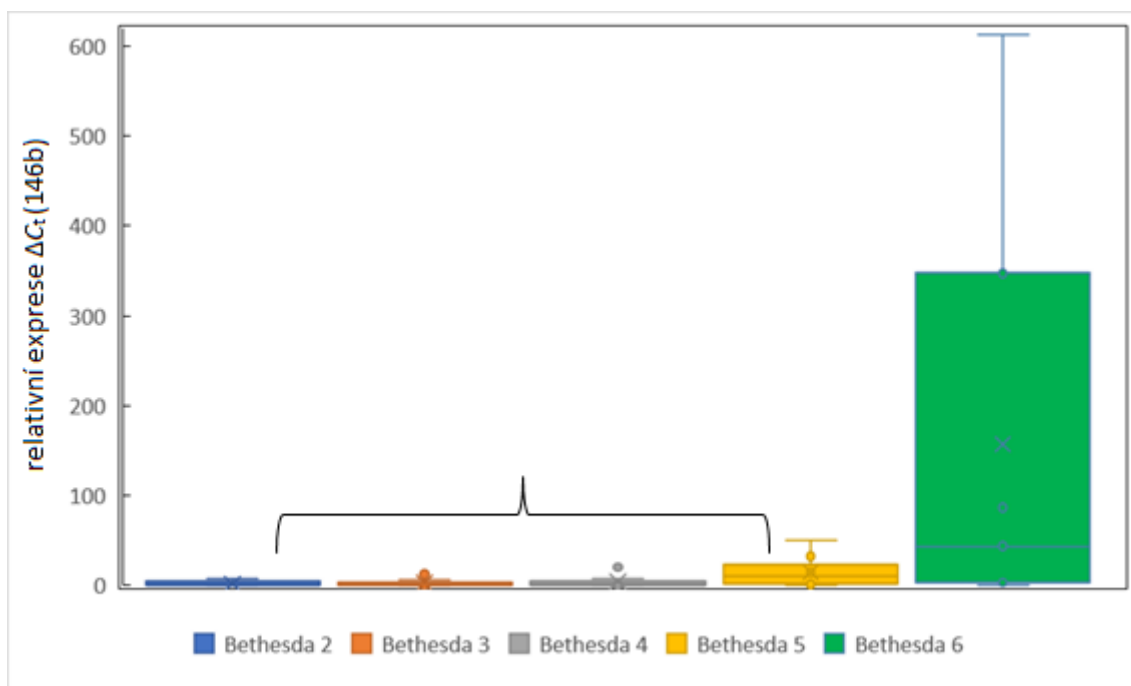
Obr. 4.12: Krabicový graf pro zlogaritmované hodnoty  $\Delta C_t$  pro miR-146b dle mutace *BRAF*. Kruskal-Wallisův test udává  $P=0,001$  (*BRAF*  $n=12$ , *BRAF* negativní  $n=35$ ).



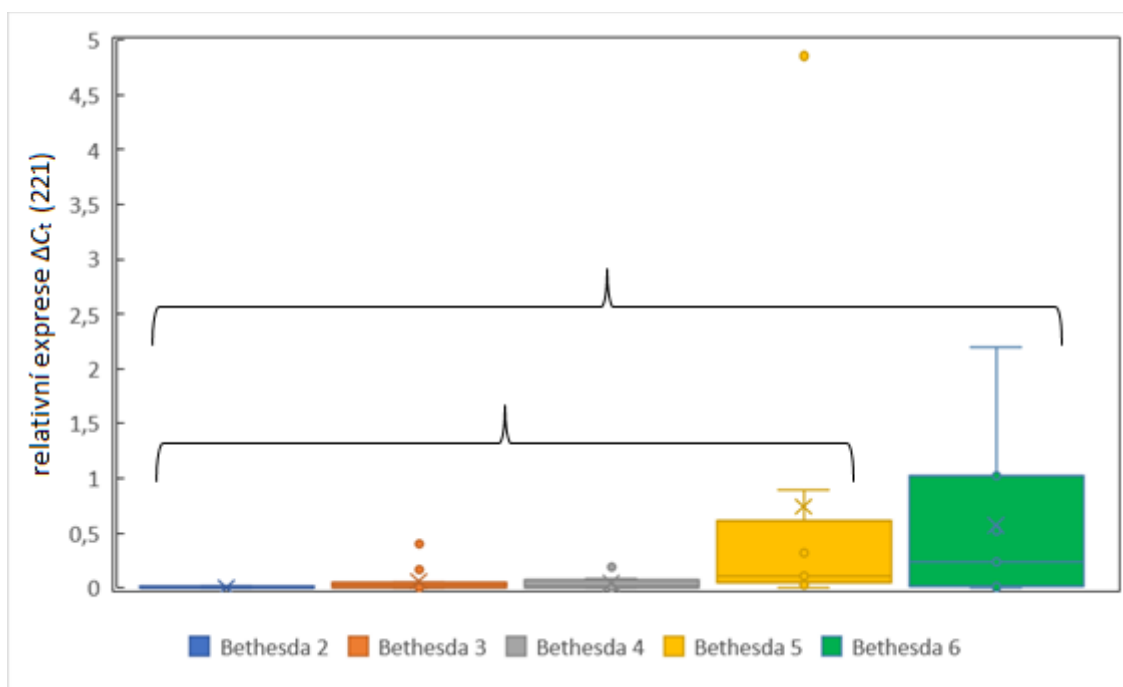
Obr. 4.13: Krabicový graf pro zlogaritmované hodnoty  $\Delta C_t$  pro miR-221 dle mutací (*BRAF*  $n=8$ , *RAS*  $n=5$ , *BRAF+TERT*  $n=4$ , negativní na mutace  $n=12$ ).



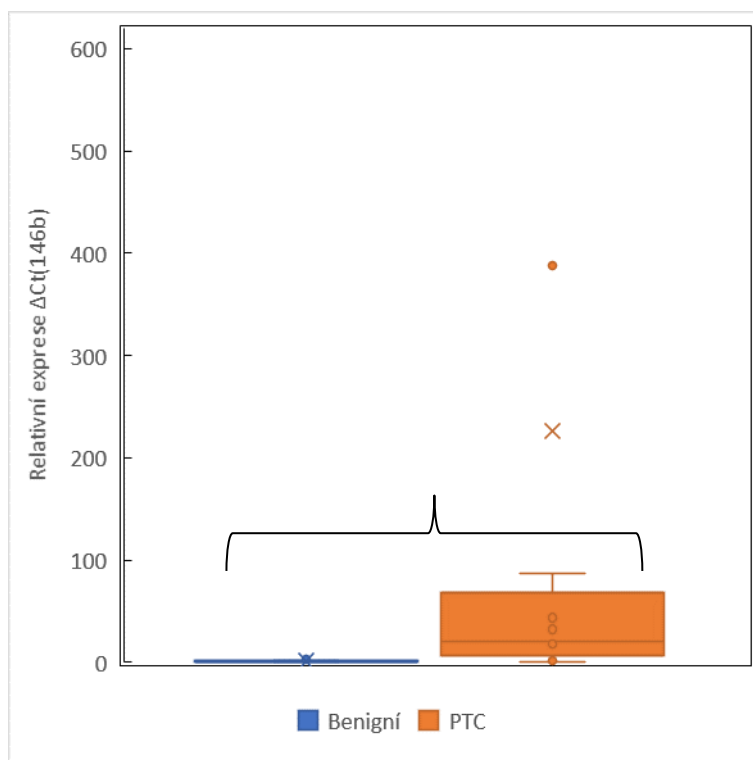
Obr. 4.14: Krabicový graf pro zlogaritmované hodnoty  $\Delta C_t$  pro miR-221 dle mutace *BRAF*. Kruskal-Wallisův test udává  $P=0,013$  (*BRAF*  $n=12$ , *BRAF* negativní  $n=32$ ).



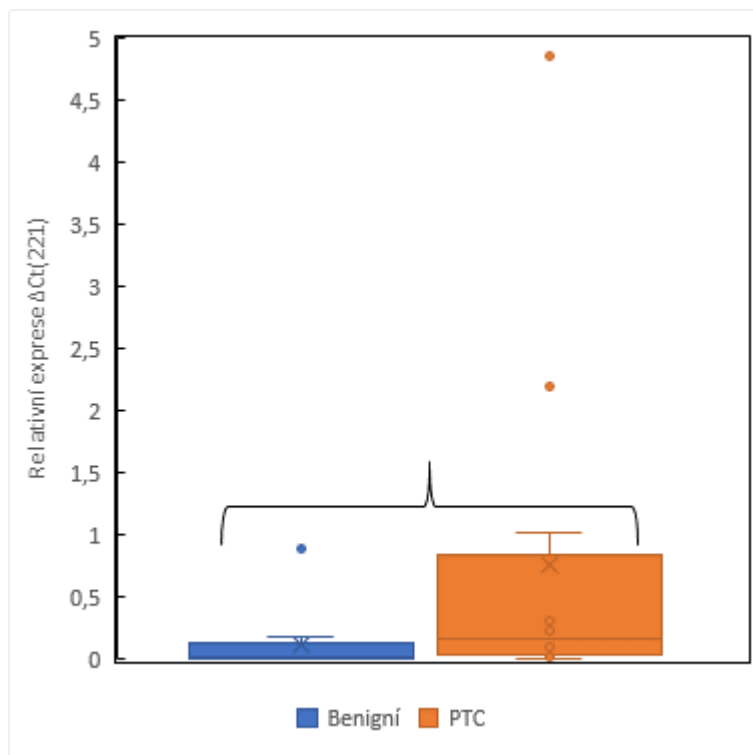
Obr. 4.15: Krabicový graf pro hodnoty relativní exprese  $\Delta C_t$  pro miR-146b dle Bethesda kategorií. B185 leží vně vyobrazený interval, hodnota jeho relativní exprese  $\Delta C_t=2281$ . Dle Kruskal-Wallisova testu je  $P=0,008$  (B2  $n=8$ , B3  $n=11$ , B4  $n=9$ , B5  $n=12$ , B6  $n=7$ ).



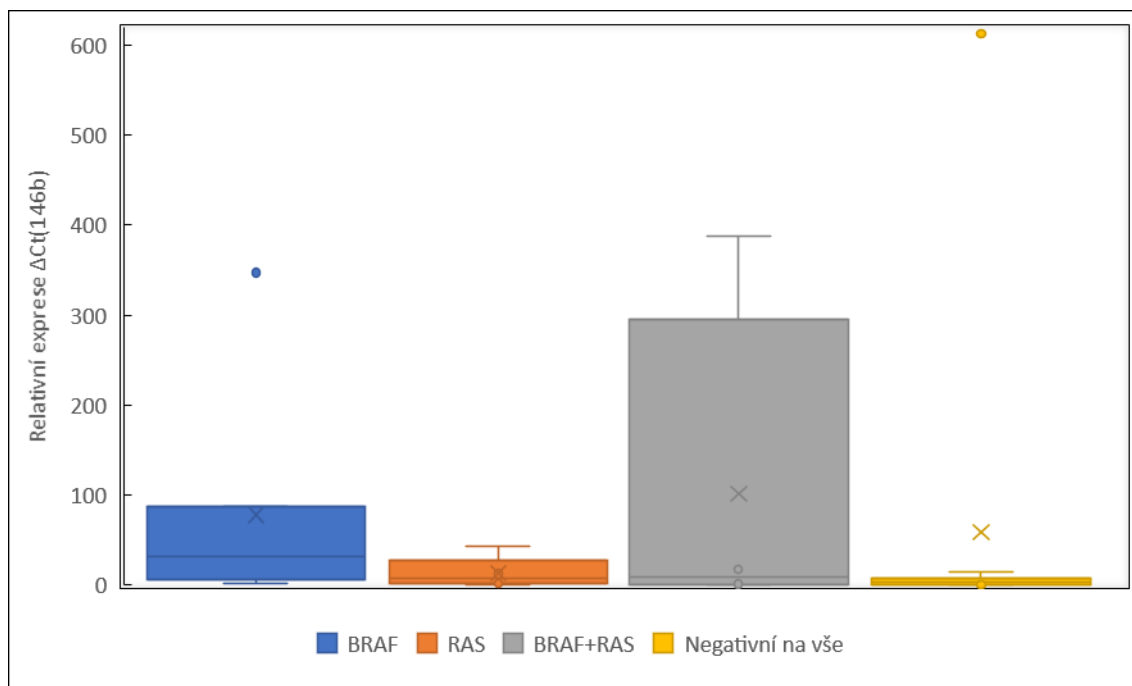
Obr. 4.16: Krabicový graf pro hodnoty relativní exprese  $\Delta C_t$  pro miR-221 dle Bethesda kategorií. B185 leží vně vyobrazený interval, hodnota jeho relativní exprese  $\Delta C_t=69,52$ . Dle Kruskal-Wallisova testu bez Bonferroniho korekce je  $P=0,001$  (B2  $n=7$ , B3  $n=11$ , B4  $n=9$ , B5  $n=10$ , B6  $n=7$ ).



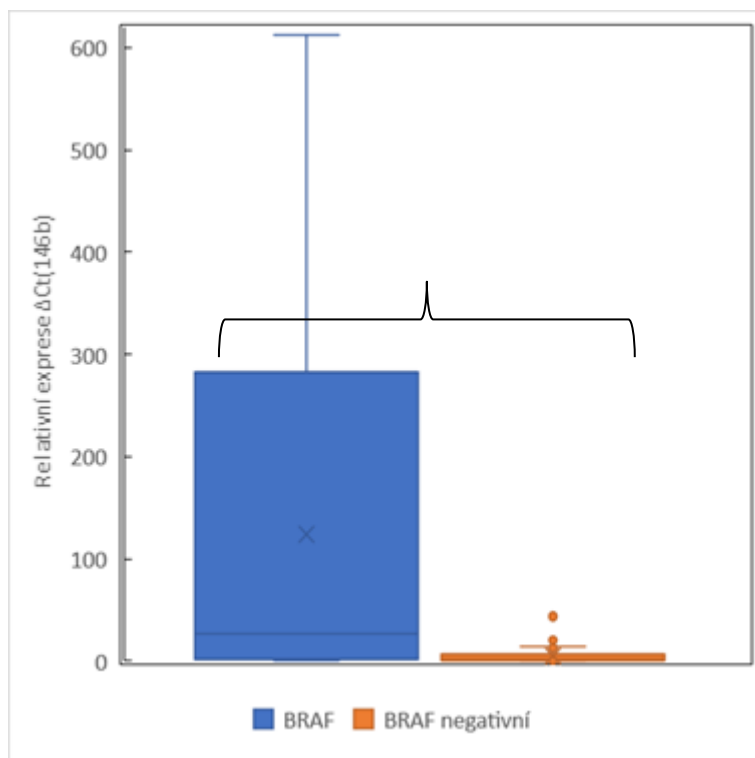
Obr. 4.17: Krabicový graf pro hodnoty relativní exprese  $\Delta C_t$  pro miR-146b dle histologie. B185 leží vně vyobrazený interval, hodnota jeho relativní exprese  $\Delta C_t=2281$ . Dle Kruskal-Wallisova testu je  $P=0,000$  (benigní  $n=11$ , PTC  $n=14$ ).



Obr. 4.18: Krabicový graf pro hodnoty relativní exprese  $\Delta C_t$  pro miR-221 dle histologie. B185 leží vně vyobrazený interval, hodnota jeho relativní exprese  $\Delta C_t=69,52$ . Dle Kruskal-Wallisova testu je  $P=0,012$  (benigní  $n=11$ , PTC  $n=13$ ).

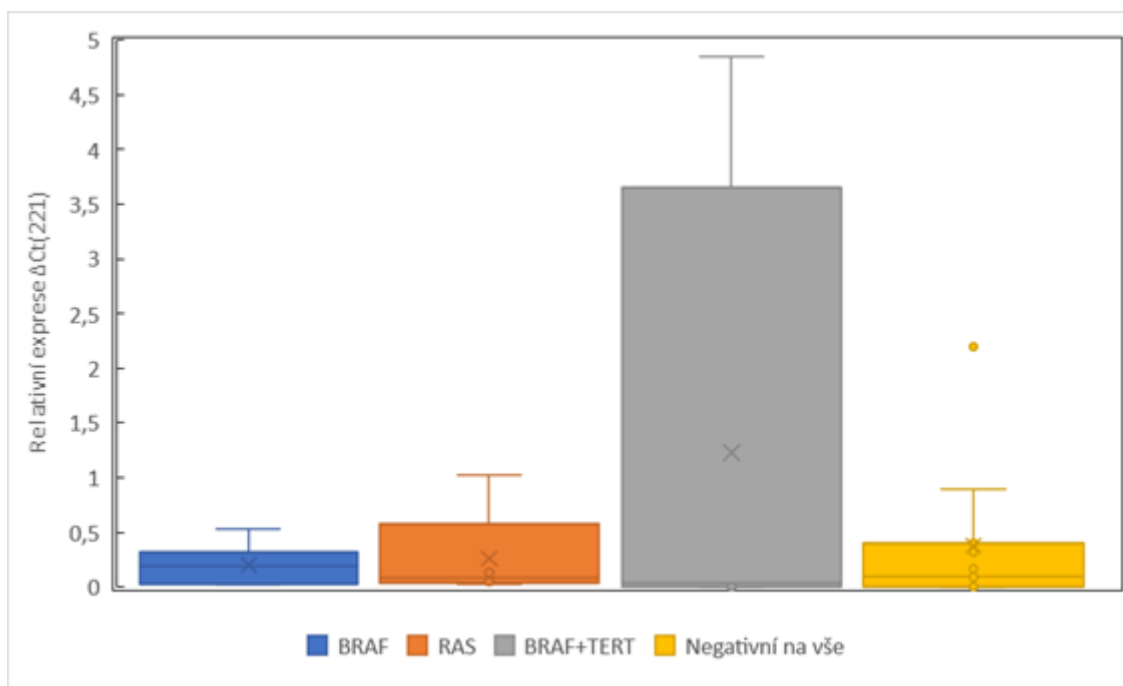


Obr. 4.19: Krabicový graf pro hodnoty relativní exprese  $\Delta C_t$  pro miR-146b dle mutací. B185 leží vně vyobrazený interval, hodnota jeho relativní exprese  $\Delta C_t=2281$  (*BRAF*  $n=8$ , *RAS*  $n=5$ , *BRAF+TERT*  $n=4$ , negativní na mutace  $n=12$ ).

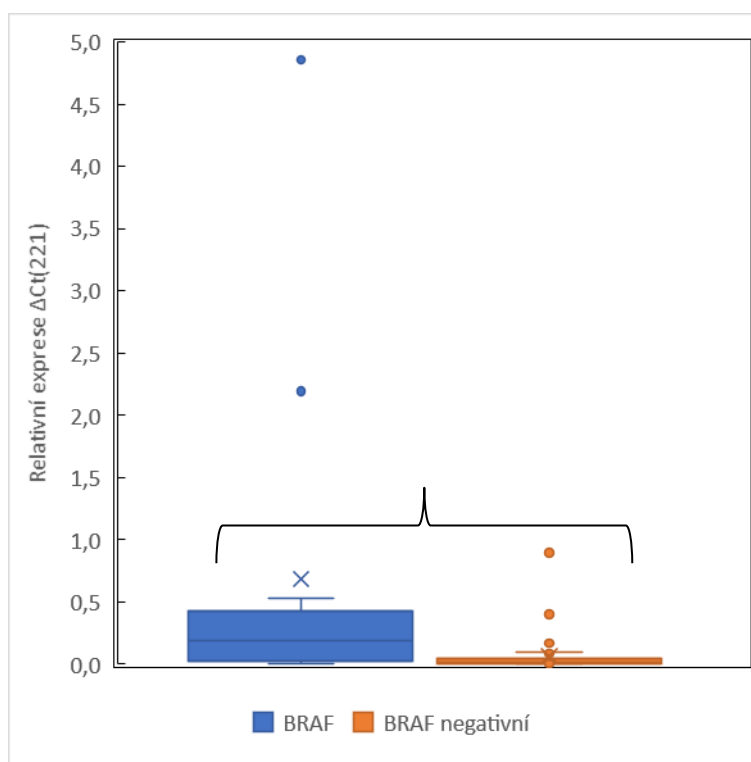


Obr. 4.20: Krabicový graf pro hodnoty relativní exprese  $\Delta C_t$  pro miR-146b dle mutace *BRAF*. B185 leží vně vyobrazený interval, hodnota jeho relativní exprese  $\Delta C_t=2281$ . Dle Kruskal-Wallisova testu je  $P=0,001$  (*BRAF*  $n=12$ , *BRAF* negativní  $n=35$ ).





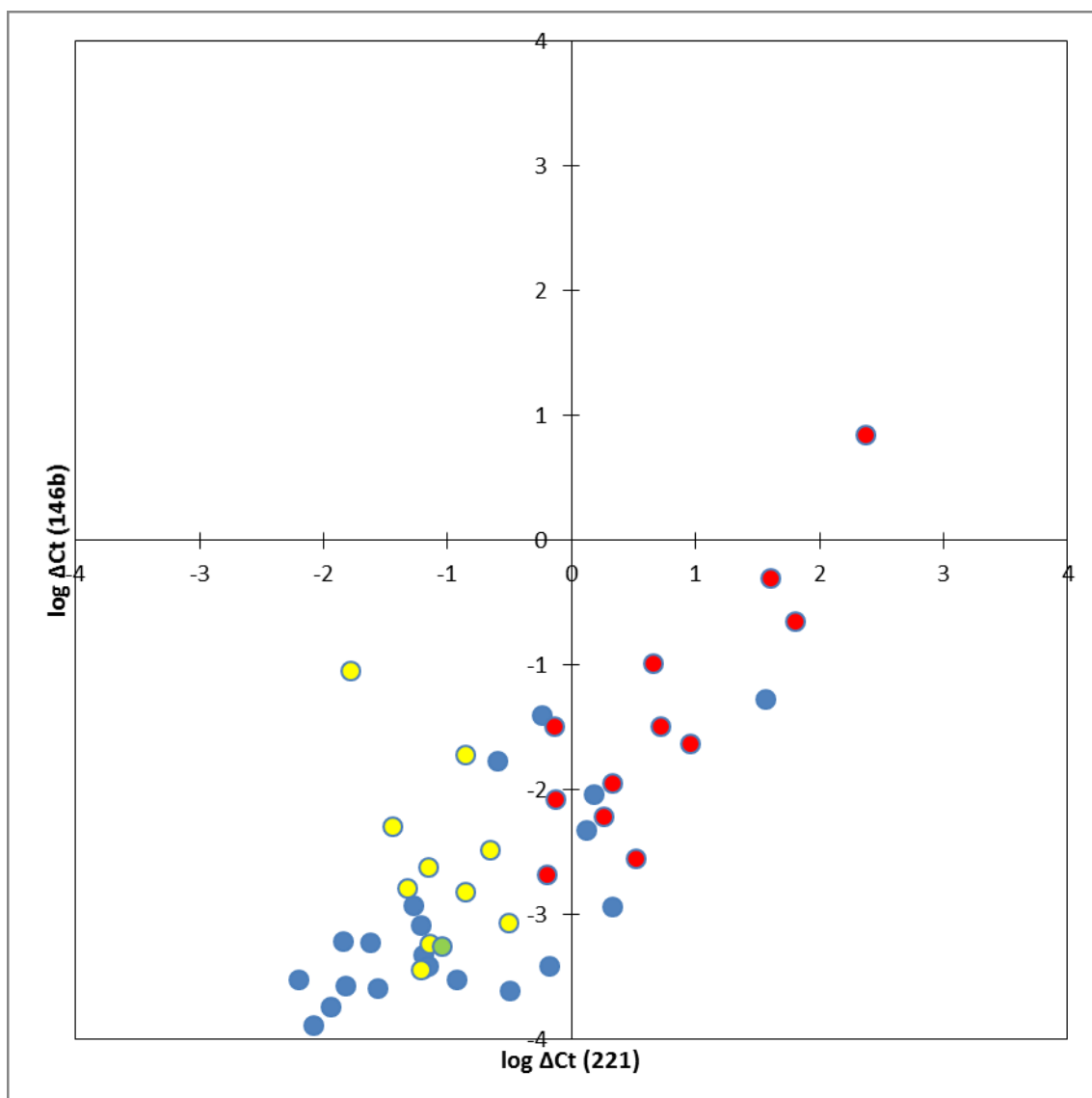
Obr. 4.21: Krabicový graf pro hodnoty relativní exprese  $\Delta C_t$  pro miR-221 dle mutací. B185 leží vně vyobrazený interval, hodnota jeho relativní exprese  $\Delta C_t=69,52$  (*BRAF*  $n=8$ , *RAS*  $n=5$ , *BRAF+TERT*  $n=4$ , negativní na mutace  $n=12$ ).



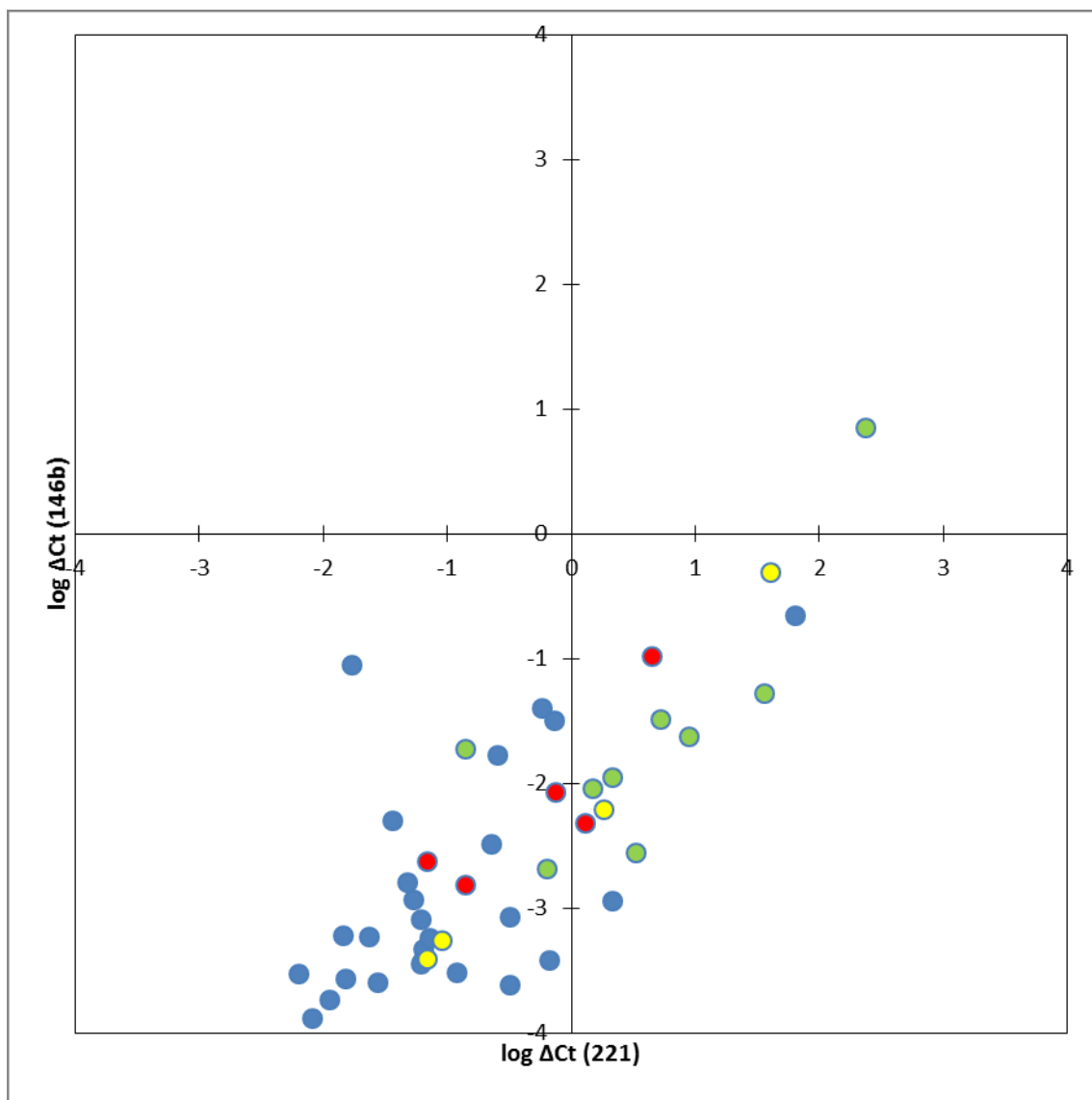
Obr. 4.22: Krabicový graf pro hodnoty relativní exprese  $\Delta C_t$  pro miR-221 dle mutace *BRAF*. B185 leží vně vyobrazený interval, hodnota jeho relativní exprese  $\Delta C_t=69,52$ . Dle Kruskal-Wallisova testu je  $P=0,013$  (*BRAF*  $n=12$ , *BRAF* negativní  $n=32$ ).

Statistický Kruskal-Wallisův test byl proveden s hodnotami dekadických logaritmů  $\Delta C_t$ . Do grafického zpracování byly použity zlogaritmované hodnoty kvůli lepší názornosti a velkým rozdílům mezi jednotlivými vzorky. Relativní exprese  $\Delta C_t$  byla vypočítána podělením průměrné exprese benigních uzlů, proto i  $P$  u relativních expresí je shodné s hodnotami  $P$  pro zlogaritmované  $\Delta C_t$ .

#### 4.2.3 Bodové grafy



Obr. 4.23: Bodový graf hodnot  $\Delta C_t$  miR-146b proti  $\Delta C_t$  miR-221 dle histologického potvrzení. Žlutě vzorky benigní, červeně s PTC, zeleně melanom, modře bez operativního ověření.



Obr. 4.24: Bodový graf hodnot  $\Delta C_t$  mir-146b proti  $\Delta C_t$  miR-221 dle detekovaných mutací. Zeleně vzorky s *BRAF* mutací, žlutě mající *BRAF* i *TERT*, červeně *RAS*, modře bez nalezené mutace.

## 5 Diskuze

Nejčastějším maligním onemocněním štítné žlázy je papilární karcinom. Většinou vzniká v důsledku bodové mutace genu *BRAF*, dále pak *RAS*, *TERT* a přeskupení *RET/PTC* či *NTRK*. Tyto geny kódují proteiny, které se podílejí na MAPK signální dráze a prokazatelně souvisí s buněčnými pochody jako je proliferace, dediferenciace, apoptóza (S. Forte et al., 2015).

K diagnostice suspektních nálezů na molekulární úrovni se za pomoci FNAB využívá dvou metodických přístupů. Buď je přímým genetickým vyšetřením potvrzena benignita tkáně (rule-out testování), maligní nález je s určitou mírou pravděpodobnosti vyloučen a pacient je ušetřen operativního zákroku, anebo je analýza koncipována tak, aby naopak detekovala genetické změny značící malignitu (rule-in testování) a umožnila optimalizaci operace. Ke stanovení genové exprese jsou na trhu k dostání komerční kity a poskytují se analýzy, které mohou být i kombinací těchto postupů (M. Eszlinger et al., 2017).

Na Oddělení molekulární endokrinologie Endokrinologického ústavu se používá rule-in přístup – analyzují se geny, jejichž mutace identifikují maligní onemocnění, což má nejen diagnostický, ale i prognostický význam. Ovšem některé mutace (např. v *RAS* genech) se vyskytují i u benigních onemocnění a riziko malignity tak není 100%. U pacientů s negativním nálezem (bez detekované mutace) naopak nelze malignitu zcela vyloučit, protože výše popsané mutace jsou příčinou pouze 70 % PTC. Proto je potřeba zavést další genetické markery, které by pomohly diagnostiku FNAB zpřesnit (Ch. Chou et al., 2017; G. C. Penna et al., 2017).

Experimentální část této bakalářské práce se soustředila na detekci miR-146b a miR-221. Obě molekuly působí jako aktivátory mechanismů buněčné proliferace a tumorigeneze. Jsou spojovány především s vývojem PTC. Jejich zvýšenou expresi dokazují mnohé studie. Bylo potvrzeno, že ve vzorcích odebraných od pacientů s PTC byla hladina miR-221 a miR-146b zvýšená oproti tkáním s benigními uzly (J. C. Lee et al., 2013; F. Rosignolo et al., 2017).

V našem souboru byly nalezeny statisticky významné rozdíly v expresi miR-146b mezi kategoriemi Bethesda 2 (benigní) a Bethesda 5 (suspektní z malignity). U miR-221 byl kromě Bethesda 2 a 5 navíc nalezen statisticky významný rozdíl také mezi Bethesda 2 a 6 (maligní). Ovšem zařazení do Bethesda kategorií znamená pouze určitou pravděpodobnost převážně benigních (Bethesda 2) nebo maligních (Bethesda 5 a 6) uzlů (Tab. 1.1, str.13). Proto jsme studovali rozdíly i u již histologicky ověřených uzlů pacientů, kteří podstoupili operaci. Nalezli jsme signifikantně významně vyšší expresi obou studovaných miRNA u histologicky potvrzených PTC vzorků v porovnání se skupinou histologicky benigních.

Uvedené miRNA se spojují i s větší agresivitou nádorů. Výzkum analyzující cluster miR-146b a miR-221/222 odhalil, že zvýšená exprese těchto látek se vyskytovala u karcinomů doprovázených kapsulární a vaskulární invazí nebo metastázami v lymfatických uzlinách (M. Boufraqueh et al., 2016). Mezinárodní studie The Cancer Genome Atlas (TCGA) shromažďující informace o genetických mutacích v souvislosti s nádory řadí miR-221 jako onkogen méně diferencovaných nádorů (N. Agrawal et al., 2014).

MiR-146b je kromě toho i předzvěstí snížené účinnosti léčby radiojodem. Dojde-li k jejímu navázání na 3'UTR genu *PAX8* nebo transportéru *NIS*, potlačí se citlivost na tuto terapii (Ch. Chou et al., 2017).

Některé studie uvádějí, že miR-146b podporuje buněčnou migraci a extratyreoidální invazi spojovanou s nálezy z vyšších Bethesda kategorií a zvýšeným rizikem recidivy PTC (J. Qui et al., 2018). Na možné prognostické využití poukázala studie zaměřená na případy neinvazivního PTC (nezahrnovala PTC s metastázami) detekcí zvýšené exprese miR-146b a miR-222 v odebraných tkáních pacientů, u nichž se v následujících letech nemoc vrátila.

Některé studie uvádějí i rozdíly v expresi v závislosti na mutaci. U miR-146b, miR-221 a miR-222 byla zároveň zvýšená exprese v přítomnosti *BRAF*<sup>V600E</sup> oproti ostatním *BRAF* mutacím, v buňce působí jiným mechanismem (N. Agrawal et al., 2014), zrovna tak v této práci má vzorek postižený *BRAF*<sup>V601K</sup> nižší hodnotu míry exprese než průměrná hodnota všech *BRAF* pozitivních. V našem souboru jsme našli signifikantně

rozdílnou expresi u *BRAF* pozitivních a *BRAF* negativních FNAB. V rámci souboru histologicky potvrzených PTC se *BRAF* mutace vyskytovala u devíti vzorků. Při porovnání jejich míry exprese obou miRNA s pěti potvrzenými PTC negativními na mutaci *BRAF* však nebyla statisticky významná odlišnost prokázána. The Cancer Genome Atlas ukazuje, že PTC lze rozdělit na dva základní genetické typy – PTC typu *BRAF* a PTC typu *RAS*. PTC typu *RAS* jsou velmi homogenní nádory se stejně změněnými miRNA, ale PTC typu *BRAF* jsou heterogenní skupinou a z pohledu miRNA se dělí na 5 clusterů s různou prognózou onemocnění. Určení těchto clusterů by mohlo dále zpřesnit prognózu onemocnění u pacientů s *BRAF* mutací, která je nejčastější mutací PTC (N. Agrawal et al., 2014).

U cytologických nátěrů jsme posuzovali použitelnost miRNA ve srovnání s miRNA z RNA lateru. U všech 3 referenčních miRNA (miR-191, miR-423, miR-103a) se získané hodnoty  $C_t$  statisticky nelišily v porovnání se vzorky z RNA lateru. Znamená to tedy, že miRNA jsou v cytologických nátěrech stabilní a jejich množství a kvalita je srovnatelná se vzorky z RNA lateru. Provedení analýzy z cytologických nátěrů by mohlo umožnit testování cytologicky již vyhodnocených suspektních vzorků a mohlo by to být přínosné pro externí doktory, kteří neprovádí tolik odběrů FNAB a není pro ně praktické odebrat vzorky do RNA lateru předem ještě před cytologickou analýzou. Studie ukazují, že miRNA jsou stabilní i ve formě parafinových bločků (FFPE), kde je analýza mRNA prakticky nepoužitelná a DNA se izoluje v horší kvalitě než ze zamraženého materiálu.

Zajímavé je také potenciální využití cirkulujících miRNA při dispenzarizaci pacientů po operaci a odhalení možné recidivy, cirkulující miRNA jsou v krevním oběhu stabilní a je možné je detekovat v plasmě či séru. (J. C. Lee et al., 2013). Míra exprese miR-146b, miR-221 a miR-222 byla před operací u PTC pozitivních zvýšená oproti zdravým jedincům a i po operaci se její významný pokles potvrdil (J. C. Lee et al., 2013). Při analýze vzorků z plazmy se potvrdila zvýšená exprese miR-146b a miR-222 u skupiny s recidivou PTC stejně jako u vzorků z tkání. Hladina miR-146b, miR-155 a miR-222 navíc roste úměrně s velikostí tumoru (E. E. Yoruker et al., 2016). K diagnostice primárního nálezu PTC jsou cirkulující miRNA nepoužitelné, jejich teoretický přínos je pouze v následné dispenzarizaci, avšak k návratu onemocnění dochází až ve 30 % případů PTC (J. C. Lee et al., 2013). Stanovení daných cirkulujících miRNA jako biomarkerů by

mohlo doplnit diagnostiku pomocí thyreoglobulinu (Tg) z krvévního séra, který není jednoznačný a vhodný pro všechny pacienty, např. v důsledku prodělání různého rozsahu chirurgické léčby či přítomnosti protilátek proti thyreoglobulinu.

Vzhledem k malému pilotnímu testovacímu souboru v bakalářské práci mohou být výsledky zkreslené. Například u Bethesda 5 je nápadný řádový rozdíl průměrné míry exprese obou miRNA oproti ostatním Bethesda kategoriím v důsledku velkého vlivu odlehle hodnoty  $C_t$  vzorku B185. Tento vzorek byl odebrán 39leté pacientce, která byla během odběru FNAB v 31. týdnu těhotenství. Uzel spadl do kategorie Bethesda 5 a byla u ní nalezena *BRAF*<sup>V600E</sup> mutace. Měsíc po biopsii (ještě před porodem) podstoupila operaci a byl u ní histologicky potvrzen PTC. Poté však změnila lékaře a informace o další terapii nám nejsou známy.

V případě užití statistického testu je doporučováno porovnávat skupiny alespoň o pěti členech, což nebylo splněno například při porovnání *BRAF*+*TERT* mutovaných ( $n=4$ ) oproti zbytku souboru. Také pro statistické porovnání vlivu *BRAF* mutace pouze ve skupině histologicky potvrzených PTC byl soubor příliš malý, rozšíření souboru by přineslo objektivnější závěry. Dále nám chybí některé informace o další léčbě pacientů, jelikož někteří pacienti byli externí nebo nepodstoupili operaci a chybí u nich histologická data. Zjištění postupu léčby u těchto jedinců a zda podstoupili chirurgické odstranění by do budoucna mohlo přislíbit další vylepšení studie a umožnilo by poznatky doplnit o klinicko-patologickou analýzu.

Zpřesnění by mohlo přinést také doplnění analýzy mutací. Vývoj schématu, podle něhož probíhají současná genetická vyšetření (Obr. 3.1, str. 27), byl postupný. Dříve se rutinně vyšetřovala u všech pacientů pouze *BRAF* mutace, postupně se zavádělo vyšetření dalších genů pomocí sekvenování nové generace a kapilární sekvenace, proto nejsou genetická data u všech vzorků kompletní. Součástí této práce byla i detekce *RET/PTC* přeskupení, které se do rutinní analýzy teprve zavádí, v našem souboru jsme ale žádné *RET/PTC* přeskupení nedetekovali.

## 6 Závěr

Bakalářská práce shrnuje poznatky světové literatury o rakovinných onemocněních štítné žlázy, soustředí se především na papilární karcinomy (PTC), které tvoří 90 % maligních nálezů a v současnosti jsou stále na vzestupu.

Tato práce zahrnovala optimalizaci reverzní transkripce miRNA a stanovení míry exprese miR-146b a miR-221. V našem souboru byly zjištěny signifikantní rozdíly mezi kategoriemi Bethesda 2 a 5 (miR-146b a miR-221) a Bethesda 2 a 6 (miR-221). V souboru histologicky potvrzených uzlů byl signifikantní rozdíl v expresi obou miRNA mezi benigními uzly a PTC. V porovnání míry exprese s ohledem na rutinně detekované mutace jsme zjistili signifikantně zvýšenou expresi obou miRNA mezi skupinou *BRAF* negativních a *BRAF* pozitivních FNAB. Také se zdá, že miRNA jsou stabilní molekuly a je možné je stanovit i z cytologických nátěrů.

Nekódující molekuly miRNA regulují na polovinu kódujících proteinů lidského genomu. Jejich potenciální přínos je nejen v diagnostickém využití při rutinní genetické analýze, ale i ve zpřesnění prognózy onemocnění a dispenzarizaci pacientů.



## Zdroje:

AGRAWAL, Nishant, Rehan AKBANI, B. Arman AKSOY, et al.: Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cell*. **159**(3), 676–690 (2014).

BAILEY, Regina.: Thyroid Gland and Its Hormones. New York, 2018. Dostupné z: <https://www.thoughtco.com/thyroid-gland-anatomy-373251> [cit. 2019-05-02]

Biopsy: Types of biopsy procedures used to diagnose cancer. Rochester, Mayo 2019. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/cancer/in-depth/biopsy/art-20043922> [cit. 2019-08-17]

BOUFRAQECH, Myriem, Joanna KLUBO-GWIEZDZINSKA a Electron KEBEBEW.: MicroRNAs in the thyroid. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. **30**(5), 603–619 (2016).

BRIERLEY, James, M. K. GOSPODAROWICZ a Ch WITTEKIND.: *TNM classification of malignant tumours*, 8th ed. Hoboken, Wiley 2017.

BUREŠ, Jan a Jiří HORÁČEK: *Základy vnitřního lékařství*. Praha, Galén 2003.

CARTHEW, Richard W. a Erik J. SONTHEIMER. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. **136**(4), 642–655 (2009).

CELANO, Marilena, Francesca ROSIGNOLO, Valentina MAGGISANO, Valeria PECCE, Michelangelo IANNONE, Diego RUSSO a Stefania BULOTTA.: MicroRNAs as Biomarkers in Thyroid Carcinoma: Focus on Aggressive Histotypes. *International Journal of Genomics*. **2017**(6496570), (2017).

CERUTTI, Lorenzo, Nina MIAN a Alex BATEMAN.: Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends in Biochemical Sciences*. **25**(10), 481–482 (2000).

CHOU, Chen-Kai, Rue-Tsuan LIU a Hong-Yo KANG.: MicroRNA-146b: A Novel Biomarker and Therapeutic Target for Human Papillary Thyroid Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. **18**(3), 636 (2017).

CIBAS, Edmund S., Syed Z. ALI a Krystian JAŹDŹEWSKI.: The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: MicroRNA in diagnostics and therapy of thyroid cancer. *Thyroid*. **27**(11), 1341–1346 (2017).

ČIHÁK, Radomír a Miloš GRIM.: *Anatomie*, 2. upr. a dopl. vyd. Praha, Grada 2002.

DNA čipy. WikiSkripta, 2018. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/DNA\\_%C4%8Dipy](https://www.wikiskripta.eu/w/DNA_%C4%8Dipy) [cit. 2018-05-03]

ESZLINGER, Markus, Lorraine LAU, Sana GHAZNAVI, Christopher SYMONDS, Shamir P. CHANDARANA, Moosa KHALIL a Ralf PASCHKE.: Molecular profiling of thyroid nodule fine-needle aspiration cytology. *Nature Reviews Endocrinology*. **13**(7), 415–424 (2017).

FORTE, Stefano, Cristina LA ROSA, Valeria PECCE, Francesca ROSIGNOLO a Lorenzo MEMEO.: The Role of MicroRNAs in Thyroid Carcinomas. *Anticancer Research*. **36**(4), 2035–2039 (2015).

HRSTKA, R., KOLÁŘOVÁ, T., MICHALOVÁ, E. a VOJTĚŠEK, B.: Vývoj metod založených na PCR a jejich aplikace v onkologickém výzkumu a praxi. *Klinická onkologie*. **27**(1), 69–74 (2014).

How TaqMan Assay work. Massachuttes, Thermo Fisher Scientific c2006-2019. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html> [cit. 2019-08-17]

JISKRA, Jan: *Poruchy štítné žlázy: Praktický přehled nejen pro laickou veřejnost*. Praha, Mladá fronta 2011a.

JISKRA, Jan: Karcinomy štítné žlázy. *Endocare*. 2011b. Dostupné z: <http://endokrinologie-obezitologie.cz/cs/clanky/tema1/karcinomy-stitne-zlazy/> [cit. 2018-04-15]

JUREČKOVÁ, Andrea. Karcinomy štítné žlázy z pohledu onkologa – systémová léčba. *Onkologie*. **10**(4), 181–184 (2016).

KOPEČKOVÁ, Kateřina: *Nádory štítné žlázy*. Praha, Mladá fronta, 2019a, s. 43.

KOPEČKOVÁ, Kateřina: *Nádory štítné žlázy*. Praha, Mladá fronta, 2019b, s. 73.

LEE, James C., Jing Ting ZHAO, Roderick J. CLIFTON-BLIGH, et al.: MicroRNA-222 and MicroRNA-146b are tissue and circulating biomarkers of recurrent papillary thyroid cancer. *Cancer*. **119**(24), 4358–4365 (2013).

LUDVÍKOVÁ, Marie; KHOLOVÁ Ivana: Přehled dosavadních zkušeností s mezinárodní klasifikací tenkojehlové aspirační cytologie štítné žlázy Bethesda 2010. *Česko-Slovenská patologie*. **50**(3), 155–160 (2014).

Mikroskopická stavba štítné žlázy. *Základy anatomie*. Brno, Masarykova univerzita 2013. Dostupné z: [https://is.muni.cz/do/fsps/e-learning/zaklady\\_anatomie/zakl\\_anatomie\\_II/pages/zlasy.html](https://is.muni.cz/do/fsps/e-learning/zaklady_anatomie/zakl_anatomie_II/pages/zlasy.html) [cit. 2019-08-14]

PENNA, Gustavo C., Fernanda VAISMAN, Mario VAISMAN, Manuel SOBRINHO-SIMÕES a Paula SOARES.: Molecular Markers Involved in Tumorigenesis of Thyroid Carcinoma: Focus on Aggressive Histotypes. *Cytogenetic and Genome Research*. **150** (3–4), 194–207 (2017).

PETR, Vojtěch.: Proč vzniká rakovina? *Medlicker*. 2013. Dostupné z: <https://cs.medlicker.com/207-proc-vznika-rakovina> [cit. 2018-05-03]

Potential Function of miRNAs in Herpetic Stromal Keratitis. Maryland, AVRO 2013. Dostupné z: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2189224> [cit. 2019-08-18]

QIU, Jie, Wenwei ZHANG, Chuanshan ZANG, Xiaomin LIU, Fuxue LIU, Ruifeng GE, Yan SUN a Qingsheng XIA.: Identification of key genes and miRNAs markers of papillary thyroid cancer. *Biological Research*. **51**(1), 45 (2018).

ROSIGNOLO, Francesca, Lorenzo MEMEO, Fabio MONZANI, et al.: MicroRNA-based molecular classification of papillary thyroid carcinoma. *International Journal of Oncology*. **50**(5), 1767-1777 (2017).

SLABÝ, Ondřej.: MikroRNA vstupují do klinického testování. *Klinická onkologie*. **25**(2), 139–142 (2012).

Sekvenování nové generace. *Lab Guide*. 2014a. Dostupné z: <http://labguide.cz/sekvenovani-nove-generace/> [cit. 2018-03-16]

TaqMan sondy. *Lab Guide*. 2014b. Dostupné z: <http://labguide.cz/taqman-sondy/> [cit. 2018-05-04]

TICHÝ, Boris, Soňa ŠTRUNCOVÁ, R BORSKÁ a Šárka POSPÍŠILOVÁ.: DNA čipy (microarrays) a jejich využití v onkologické diagnostice. Brno, 2004. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/dna-cipy-microarrays-a-jejich-vyuziti-v-onkologicke-diagnostice/> [cit. 2018-05-03]

VASUDEVAN, S., Y. TONG a J. A. STEITZ.: Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science*. **318**(5858), 1931–1934 (2007).

VLČEK, Petr.: Současné léčebné možnosti nádorů štítné žlázy. *Remedia*. **25**(3), 188–191 (2015).

VLČEK, Petr.: Diferencovaný karcinom štítné žlázy – nový pohled na jeho léčbu. *Onkologie*. **5**(6), 329–332 (2011).

WINTER, Julia, Stephanie JUNG, Sarina KELLER, Richard I. GREGORY a Sven DIEDERICHs.: Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*. **11**(3), 228–234 (2009).

WÓJCICKA, Anna, Monika KOLANOWSKA a Krystian JAŻDŻEWSKI.: MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: MicroRNA in diagnostics and therapy of thyroid cancer. *European Journal of Endocrinology*. **174**(3), 89–98 (2016).

YORUKER, Ebru Esin, Duygu TERZIOGLU, Serkan TEKSOZ, Fatma Ezel USLU, Ugur GEZER a Nejat DALAY.: MicroRNA Expression Profiles in Papillary Thyroid Carcinoma, Benign Thyroid Nodules and Healthy Controls. *Journal of Cancer*. **7**(7), 803–809 (2016).

ZHANG, Yan, WARNKE, Karl, ed.: Pre-miRNA: nach der Handschrift des Mus. Brit. Harl. 978 mit Einleitung und Glossar. *Encyclopedia of Systems Biology*. New York, Springer 2013, s. 1735–1736.